



# UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI TRIESTE

Sede Amministrativa del Dottorato di Ricerca

Università degli studi di Trieste Dipartimento di Scienze della Riproduzione e dello Sviluppo

XXII CICLO DEL

DOTTORATO DI RICERCA IN

MEDICINA MATERNO INFANTILE, PEDIATRIA DELL'EDUCAZIONE, DELLO SVILUPPO E  
PERINATOLOGIA

## TITOLO DELLA TESI

***PROGETTISTICA HARDWARE E SOFTWARE NELL'APPLICAZIONE  
DELLA TOPOGRAFIA OTTICA SUL NEONATO: VALUTAZIONE DEI  
RAPPORTI ANATOMICI TRA PUNTI DI REPERE ESTERNI E AREE  
ANATOMICO-FUNZIONALI CEREBRO CORTICALI***

Settore scientifico-disciplinare MED/38 (Pediatria generale e specialistica)

DOTTORANDO  
**STEFANO MASSACCESI**

RESPONSABILE DOTTORATO DI RICERCA  
**DR. ALESSANDRO VENTURA**

RELATORE

**DR. ANDREA CLARICI**

**DIP. SCIENZE RIPRODUZIONE E SVILUPPO**

**ANNO ACCADEMICO 2008/2009**

# UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI TRIESTE

Sede Amministrativa del Dottorato di Ricerca

Università degli studi di Trieste Dipartimento di Scienze della Riproduzione e dello Sviluppo

XXII CICLO DEL

DOTTORATO DI RICERCA IN

MEDICINA MATERNO INFANTILE, PEDIATRIA DELL'EDUCAZIONE, DELLO SVILUPPO E  
PERINATOLOGIA

## TITOLO DELLA TESI

***PROGETTISTICA HARDWARE E SOFTWARE NELL'APPLICAZIONE  
DELLA TOPOGRAFIA OTTICA SUL NEONATO: VALUTAZIONE DEI  
RAPPORTI ANATOMICI TRA PUNTI DI REPERE ESTERNI E AREE  
ANATOMICO-FUNZIONALI CEREBRO CORTICALI***

Settore scientifico-disciplinare MED/38 (Pediatria generale e specialistica)

DOTTORANDO  
**STEFANO MASSACCESI**

RESPONSABILE DOTTORATO DI RICERCA  
**DR. ALESSANDRO VENTURA**

DIPARTIMENTO DI SCIENZE DELLA  
RIPRODUZIONE E DELLO SVILUPPO  
UNIVERSITA' DI TRIESTE  
Direttore: P. A. VENTURA  
Via dell'Imm. 05/1 - 34137 TRIESTE

RELATORE

**DR. ANDREA CLARICI**  
DIP. SCIENZE RIPRODUZIONE E SVILUPPO

ANNO ACCADEMICO 2008/2009

## **Ringraziamenti**

*Ringrazio tutti i colleghi e i professori che mi hanno sostenuto, aiutato e consigliato, in questi tre anni di formazione. In particolare ringrazio la Professoressa Teresa Farroni, docente di Psicologia dello Sviluppo presso l'Università degli Studi di Padova, che con la sua esperienza e professionalità, unite alla passione per la ricerca e la capacità didattica, ha reso possibile e facilitato l'apprendimento e la stesura della parte teorica della tesi concernente tutti gli aspetti evolutivi del neonato.*

<b>INTRODUZIONE</b>	pag. 1
<b>CAPITOLO 1</b> Presentazione anatomico funzionale del sistema nervoso: breve introduzione sulle varie strutture che lo compongono e le funzioni che lo classificano	pag. 3
1.1 Introduzione	pag. 3
1.2 Il sistema nervoso	pag. 6
1.3 La corteccia cerebrale	pag. 10
1.4 Classificazione anatomico funzionale del sistema nervoso	pag. 11
1.4.1 Il Telencefalo e le sue parti	pag. 12
1.4.2 Corteccia cerebrale: breve ripasso sulle principali caratteristiche	pag. 22
1.4.3 Il Diencefalo e le sue parti	pag. 23
1.5 Il Mesencefalo e le sue parti	pag. 23
1.6 Il Romboencefalo e le sue parti	pag. 24
<b>CAPITOLO 2</b> Sviluppo del cervello	pag. 26
2.1 Sviluppo post natale del cervello: differenze tra cervello adulto e cervello del neonato	pag. 27
2.2 Sviluppo prenatale del cervello	pag. 28
2.2.1 Mitosi/Proliferazione: neuroni e cellule gliali	pag. 34
2.2.2 Migrazione	pag. 35
2.2.3 Differenziazione	pag. 37
2.2.4 Sviluppo della corteccia cerebrale	pag. 38
2.2.5 Aggregazione	pag. 38
2.2.6 Sinaptogenesi	pag. 38
2.2.6.1 Sinaptogenesi: attrazione verso le cellule target	pag. 39
2.2.7 Morte neuronale	pag. 39
2.2.8 Riorganizzazione sinaptica	pag. 40
2.2.9 Mielinizzazione	pag. 40
2.3 Conclusioni	pag. 41



<b>CAPITOLO 3</b> Tecniche di indagine dei tessuti biologici	pag. 42
3.1 Stato dell'arte	pag. 42
3.2 La Tomografia Assiale Computerizzata (TAC)	pag. 42
3.3 La Risonanza Magnetica Nucleare (RM)	pag. 43
3.4 L'Elettroencefalogramma (EEG)	pag. 43
3.5 I Potenziali Evento Correlati (ERP - Event Related Potential -)	pag. 44
3.6 La Magnetoencefalografia (MEG)	pag. 44
3.7 La Tomografia ad Emissioni di Positroni (PET)	pag. 45
3.8 La Risonanza Magnetica funzionale (fMRI)	pag. 45
3.9 Il NIRs	pag. 46
3.9.1 Parametri ottici e fisiologici	pag. 46
3.9.2 Principi generali e funzionalità del NIRs	pag. 51
3.9.3 Tre tipologie di spettroscopia NIR	pag. 55
3.9.4 Vantaggi e svantaggi del NIRs	pag. 58
3.9.5 L'applicazione del NIRs su soggetti adulti	pag. 60
3.9.6 Conclusioni	pag. 63
<b>CAPITOLO 4</b> Breve rassegna sulle varie strutture anatomicofunzionali che compongono la testa con particolare approfondimento all'emodinamica dei tessuti biologici	pag. 64
4.1 Anatomia del cranio	pag. 64
4.1.1 Pelle	pag. 64
4.1.2 Cranio	pag. 65
4.1.3 Fluido cerebrospinale	pag. 65
4.1.4 Aree cerebrali	pag. 66
4.1.5 Emisferi cerebrali	pag. 66
4.1.6 Cervello medio	pag. 67
4.1.7 Tronco cerebrale	pag. 68

4.1.8 Cervelletto	pag. 68
4.2 Emodinamica dei tessuti biologici	pag. 68
4.2.1 Basi di fisiologia	pag. 69
4.3 Il sangue	pag. 71
4.4 Scambio molecolare	pag. 74
4.5 Circuito cardiovascolare	pag. 77
4.6 Trasporto e diffusione dei gas	pag. 79
4.6.1 Ossigeno	pag. 80
4.6.2 Biossido di carbonio	pag. 81
4.7 Fattori che influenzano il flusso sanguigno	pag. 81
4.8 Emodinamica globale: regolazione della pressione sanguigna	pag. 83
<b>CAPITOLO 5</b> La spettroscopia nel vicino infrarosso: principi di funzionamento in relazione all' emodinamica tissutale	pag. 85
5.1 Introduzione	pag. 85
5.2 Tecnica BOLD	pag. 86
5.3 Confronto NIRs BOLD-fMRI	pag. 87
5.4 Emodinamica cerebrale	pag. 88
5.4.1 Segnale emodinamico lento	pag. 89
5.4.2 Interferenze biologiche	pag. 90
5.5 Proprietà ottiche dei tessuti	pag. 91
5.5.1 Assorbimento	pag. 91
5.5.2 Assorbimento dei componenti del tessuto biologico	pag. 92
5.5.2.1 Acqua	pag. 93
5.5.2.2 Grassi	pag. 94
5.5.2.3 Emoglobina	pag. 94
5.5.3 Scattering	pag. 97
5.6 Propagazione della luce in un mezzo omogeneo	pag. 100

5.6.1 Teoria analitica	pag. 101
5.6.2 Teoria del trasporto	pag. 101
5.7 Effetto dello scattering	pag. 102
5.7.1 Inserimento del fattore di scattering sulla legge di Lambert Beer	pag. 104
5.8 Fattore Differenziale di lunghezza del Percorso	ag. 105
5.9 Metodi per la determinazione del DPF	ag. 107
5.10 Calcolo delle concentrazioni	ag. 109
5.11 Conclusioni	pag. 110
<b>CAPITOLO 6</b> Dalla teoria alla pratica: progettazione della cuffietta (probe) prototipo	pag. 111
6.1 Caratteristiche generali del probe per il NIRs: materiali selezionati ed utilizzati	pag. 111
6.2 Preparazione dei materiali, strumentazione utilizzata e tecnica di realizzazione	pag. 112
6.3 Realizzazione del primo prototipo: strumenti e tecnica di lavorazione	pag. 115
6.4 Calcolo della distanza interoptodica	pag. 118
<b>CAPITOLO 7</b> Dal prototipo alla prima cuffietta definitiva: realizzazione della cuffia Base	pag. 122
7.1 Progettazione del supporto del probe	pag. 122
7.1.1 Realizzazione del supporto per il probe : probe Base	pag. 123
7.2 Progettazione e realizzazione del probe Malleabile	pag. 128
7.2.1 Istruzioni di montaggio del probe Malleabile in base alle aree di interesse	pag. 133
7.2.2 Rilevazione parieto-temporale	pag. 134
7.3 Progettazione e realizzazione del probe Deformabile	pag. 137
7.3.1 Realizzazione della cuffia Deformabile: tecnica di lavorazione	pag. 143
<b>CAPITOLO 8</b> Progettazione e realizzazione del software per rilevare i punti di repere e agevolare il corretto posizionamento della cuffietta sulla testina del neonato	pag. 146
8.1 Il Sistema Internazionale 10-20	pag. 146
8.1.1 Fasi per la determinazione degli elettrodi nel Sistema Internazionale 10-20	pag. 147

8.2 Progettazione del software	pag. 148
8.2.1 Introduzione	pag. 149
8.2.2 Pianificazione del progetto	pag. 150
8.3 S.T.B.M. (System 10-20 Topographic Brain Mapping ver. n. 8)	pag. 150
<b>CAPITOLO 9</b> Tecnica di costruzione della testa da utilizzare come modello di riferimento nel programma S.T.B.M.	pag. 173
9.1 Realizzazione delle immagini per il software S.T.B.M.	pag. 173
9.2 Costruzione delle immagini del cervello da utilizzare con il programma S.T.B.M.	pag. 183
<b>CONCLUSIONI</b>	pag. 187
<b>RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI</b>	pag. 189

## INTRODUZIONE

Questa tesi di dottorato è rivolta a coloro che utilizzano come tecnica di indagine dei tessuti biologici la spettroscopia nel vicino infrarosso (Near Infrared Spectroscopy), interessati ad acquisire alcune delle conoscenze alla base del meccanismo di azione della spettroscopia e le competenze per adattare lo strumento allo studio di superfici tissutali molto piccole e a volte irregolari, come la superficie cranica di un neonato, sia nato a termine che pretermine. Si presenta articolata in due parti: una prima sezione teorica ed una seconda sezione pratica. La parte teorica è sviluppata in modo tale che, dopo una breve introduzione sulle teorie dello sviluppo del cervello, il lettore acquisisca per gradi le conoscenze anatomico funzionali di base del cervello, con particolare riferimento alla corteccia cerebrale e all'emodinamica tissutale. La tesi inizia con una descrizione anatomico funzionale del sistema nervoso e delle principali strutture e funzioni che lo classificano per poi passare alla descrizione di come si sviluppa, trattando i principali meccanismi che regolano lo sviluppo dell'embrione e la formazione del sistema nervoso e le differenze principali tra un cervello adulto e quello di un neonato. Poi passa in rassegna le principali tecniche di indagine dei tessuti biologici, tecniche che possono essere più o meno invasive e più o meno adatte ad essere utilizzate con i neonati. In questa parte è introdotta, come tecnica di indagine poco invasiva, la spettroscopia nel vicino infrarosso, il NIRs. Questa tecnica è resa possibile grazie alle proprietà ottiche dei tessuti e alle caratteristiche fisiche della luce che, per certe lunghezze d'onda, a contatto con i nostri tessuti, può essere in parte assorbita ed in parte restituita. Per capirne il funzionamento occorre conoscere alcune delle principali caratteristiche dei tessuti che la luce deve attraversare. Per questo motivo dopo l'introduzione allo strumento, la tesi procede con una breve rassegna sulle varie strutture anatomico funzionali che compongono la testa, partendo dalla pelle ed analizzando le strutture sottostanti fino al tronco encefalico e al cervelletto, con particolare approfondimento alle basi di fisiologia necessarie per comprendere l'emodinamica dei tessuti biologici e in particolare l'emodinamica cerebrale. Per finire, vengono analizzate le proprietà ottiche dei tessuti con alcuni dei meccanismi fisici più importanti come l'assorbimento e lo scattering.

Segue alla sezione teorica, quella pratica. La spettroscopia nel vicino infrarosso trasporta e rileva la luce sul tessuto, tramite fibre ottiche. Le fibre ottiche possono essere di numero variabile in base al numero di canali del modello NIRs. La parte pratica della tesi è rivolta alla progettazione e realizzazione del supporto (cuffia o probe) per le fibre ottiche, da utilizzare con gli infant, sia nati a termine che pretermine. La progettazione ha tenuto conto sia delle leggi fisiche alla base del trasporto del segnale luminoso, sia degli aspetti anatomico funzionali della delicata superficie cranica del neonato. Sono descritti i materiali utilizzati, gli strumenti e la tecnica di lavorazione per produrre il primo prototipo di cuffia, testato direttamente sui neonati. Dal prototipo è stata sviluppata la cuffia definitiva, chiamata Base e alcune varianti, tra cui le principali sono: la cuffia Malleabile e la cuffia Deformabile. Sono descritti i materiali utilizzati in ogni variante e la tecnica di lavorazione, compresi gli strumenti. L'ultima parte della tesi è rivolta alla progettazione e realizzazione di un software per rilevare i punti di repere e agevolare il corretto posizionamento della cuffietta sulla testina del neonato, in base alle aree indagate. Dal progetto è nato il programma S.T.B.M (System 10-20 Topographic Brain Mapping ver. n 8). La tesi si conclude con la descrizione di tutti i passaggi, dall'avvio alla chiusura del programma, necessari per comprenderne il corretto funzionamento e la tecnica di costruzione delle immagini del cervello e della testina di neonato, utilizzate dal programma per rappresentare i punti di riferimento del sistema 10-20, con relative distanze in mm.

## Capitolo 1

### **Presentazione anatomo-funzionale del sistema nervoso: breve introduzione sulle varie strutture che lo compongono e le funzioni che le classificano**

#### **1.1 Introduzione**

La storia delle scienze cognitive è caratterizzata dal dilemma Natura e Cultura, nota anche con etichette diverse quali “eredità verso ambiente”, “nativismo verso empirismo”, maturazione verso apprendimento”, “abilità innate verso abilità acquisite”. Molti ricercatori si interrogano sui diversi livelli di sviluppo e nonostante la maggior parte concordi nel ritenerlo il risultato delle complesse interazioni tra influenze innate ed esperienza, la controversia continua.

Secondo Bates, Elman, Johnson, Karmiloff-Smith, Parisi e Plunkett (1998), il dilemma è dovuto alla mancanza di una teoria precisa e verificabile del processo di interazione tra teorie genetiche e processi ambientali. La teoria dell’interazione presuppone come prodotto di interazione non la semplice somma dei fattori che la costituiscono ma una forma emergente, nuova, per cui non è possibile prevedere interamente le cause che l’hanno originata (Bates e coll., 1998).

Molto spesso il termine “innato” viene confuso con concetti quali dominio specifico e localizzato. Attraverso un’interpretazione delle due nozioni ci si può porre l’obiettivo di chiarire se questi contenuti appartengono o meno all’innatismo.

Si parla di dominio specifico in relazione ad abilità particolari raggruppate in un sistema (dominio) specifico. Un esempio concerne la percezione dei volti, che rappresenta uno dei processi cognitivi più importanti nel permettere la socializzazione e consente di entrare a far parte della società di appartenenza, mettendoci in relazione con le altre persone.

Il concetto di dominio specifico ha origine nell’assunto per cui si ritiene che la mente sia composta da una collezione di moduli specializzati nelle diverse abilità cognitive e nelle diverse aree di attività. Questi moduli sarebbero innati, cioè codificati nel genoma e presenti alla nascita e rimarrebbe solo da capire quali e quanti sono questi moduli e come sono fatti (Fodor 1983).

Nella descrizione di modulo di Fodor (1983) la specificità di dominio è considerata la più importante caratteristica. Questa proprietà sottolinea il fatto che un modulo si occupa solo dell’elaborazione di un determinato tipo di informazione.

Liu e Chaudhuri (2003) suggeriscono sia appropriato, quando si parla di specificità di dominio, non considerarla in termini assoluti, in quanto si può anche ipotizzare che un modulo

possa essere coinvolto nella manipolazione di più di un tipo di informazione mantenendo il suo status di specificità.

Qualunque sia la verità, un modulo specifico può essere ugualmente presente alla nascita o svilupparsi dopo un certo periodo di tempo e la stessa caratteristica di specificità può essere inizialmente presente in un dominio e successivamente adattarsi a differenti domini (Liu e Chaudhuri, 2003).

La localizzazione stabilisce che le strutture mentali sono innate quando risiedono in una determinata parte del cervello, ma se si dimostrasse che esiste una locazione definitiva di una funzione non si potrebbe più spiegare la plasticità corticale; anche se molte strutture anatomiche e substrati neurali delle funzioni del cervello sono geneticamente determinate, il cervello ha dimostrato la capacità di riorganizzare le sue funzioni cognitive in casi particolari di deprivazione o di lesioni (Liu e Chaudhuri, 2003).

Tutto ciò che conosciamo è mediato dal cervello e ogni nuova informazione che apprendiamo, cambia la struttura mentale anche se in misura minima. Un'abilità innata non da conferme sul fatto che essa debba essere realizzata in un luogo specifico, la localizzazione non presuppone che vi sia qualcosa di innato, ma l'innatismo pretende una base fisica (Bates e coll., 1998).

Come ci si può porre, allora, di fronte allo studio di abilità che nel corso del tempo, attraverso diverse ricerche, hanno portato con sé conclusioni spesso in contraddizione?

Gottlieb (2001), nella sua *Metateoria Psicobiologica dello Sviluppo*, propone livelli di analisi che co-agiscono in modo bidirezionale tra struttura e funzione nello sviluppo. Tre sono i livelli: genetico, neurale e comportamentale; uno il livello ambientale costituito da tre componenti: fisico, sociale e culturale. Inoltre egli suggerisce dei concetti che possono essere considerati connessi con le concezioni sullo sviluppo in Neuropsicologia.

L'Epigenesi Probabilistica, propone un'iniziale stato di equipotenzialità e lo sviluppo consiste nel progressivo restringimento dei percorsi e degli esiti evolutivi possibili. La risultante dipende dall'insieme specifico di vincoli che hanno agito nel corso dello sviluppo. Ciò significa che dotazione genetica ed esperienza co-determinano lo sviluppo, influenzandosi reciprocamente in un processo di interazione dinamica. Nel corso dello sviluppo, attraverso l'interazione tra gli elementi preesistenti e l'ambiente esterno, emergono meccanismi e processi che non facevano parte del patrimonio biologico innato del soggetto. Questo concetto è alla base anche della Teoria dell'Interazione proposta da Bates e coll. (1998) per cui lo sviluppo è una forma emergente non semplice fusione tra genetica ed esperienza.



Il ruolo dell'esperienza, non è sinonimo di ambiente ma si riferisce all'attività funzionale di tutti i livelli di analisi, inclusa l'attivazione elettrica endogena o evocata delle cellule nervose e dei loro processi, conduzione degli impulsi, secrezioni neurochimiche ed ormonali, l'utilizzo e l'esercizio dei muscoli e degli organi di senso (spontaneo, interocettivo, propriocettivo, exteroceptive), il comportamento e l'organismo stesso.

Il principio dell'Equifinalità può assumere due significati: organismi che hanno le stesse condizioni iniziali di sviluppo possono raggiungere lo stesso sviluppo attraverso vie diverse; organismi con condizioni diverse di sviluppo possono raggiungere lo stesso punto finale di sviluppo utilizzando le stesse vie o vie diverse.

Il principio dell'Equipotenzialità, adatto alla comprensione del fenomeno compensatorio osservato in presenza di danni cerebrali, afferma che ogni cellula del corpo ha le stesse potenzialità, in quanto ogni cellula del corpo ha lo stesso corredo genetico ed è capace di diventare una cellula del sistema organico. Le cellule non perdono questa abilità neppure dopo essersi differenziate e diventate una parte definita di un sistema particolare dell'organismo (Gottlieb, 2001).

La ricerca sta dimostrando negli ultimi anni che non ci può essere solo innato o solo appreso, che la mente non sia la tabula rasa identificata da Piaget (1967) e che la struttura cerebrale presente alla nascita mostra elementi innati in grado di attivarsi in qualche modo, diverso dal presupporre che il bambino nasca con una dotazione di abilità percettive e cognitive complete e ben sviluppate, specifiche per ogni dominio. L'informazione genetica è una guida generale per l'organizzazione del cervello e delle sue aree ma che può realizzarsi solo con l'esperienza sensoriale. Struttura, processi ed esperienze percettive, quindi, sono tutti elementi che concorrono congiuntamente a produrre i comportamenti manifesti, fattori concatenati che stanno alla base di tutti i cambiamenti evolutivi.

## 1.2 Il sistema nervoso

Il sistema nervoso si suddivide in sistema nervoso centrale (SNC) e sistema nervoso periferico (SNP). Il primo è costituito dal cervello (encefalo) e dal midollo spinale e il secondo dai nervi periferici e dai gangli (Figura 1, 1.2).

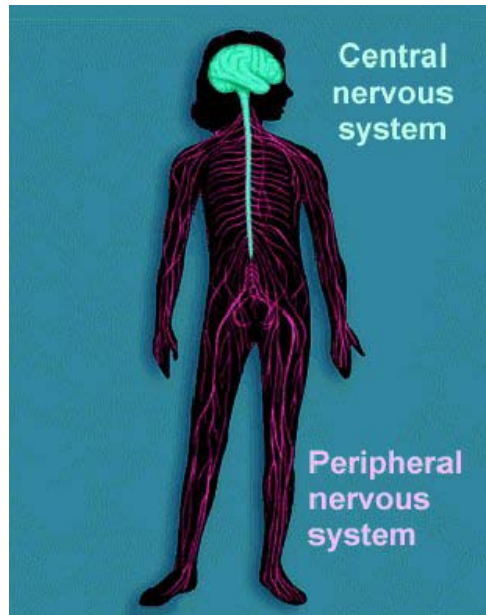


Figura 1 (Sistema nervoso centrale di colore blu e sistema nervoso periferico di colore rosa)

Il sistema nervoso è l'organo del nostro corpo che ci consente di: (a) percepire e reagire all'ambiente circostante; (b) coordinare le funzioni degli altri organi in modo che il corpo possa sopravvivere (nutrendosi, bevendo, respirando, muovendosi e riproducendosi); (c) accumulare, organizzare e mettere a frutto le esperienze passate. Si suddivide in: (a) sistema nervoso centrale che è contenuto all'interno dei compartimenti ossei del cranio e del rachide; (b) sistema nervoso periferico che è costituito dai nervi periferici della cute, dei muscoli, delle ossa e delle articolazioni, che comprende il sistema nervoso autonomo che regola l'attività degli organi interni e il sistema nervoso enterico diffuso che regola il tratto gastrointestinale.

Il cervello ha un peso considerevole a fronte di un ben scarso, per non dire nullo, sostegno strutturale, dato che nel cervello mancano elementi scheletrici. Per superare questa potenziale

difficoltà, l'encefalo è immerso in un fluido, detto liquido cerebrospinale (LCS o CSF, da cerebrospinalfluid, o liquido cefalorachidiano o liquor), che lo mantiene in sospensione. Ciò alleggerisce la pressione a cui il cervello sarebbe sottoposto, se fosse semplicemente poggiato sulla base del cranio. Il liquido cerebrospinale, inoltre, attutisce i potenziali traumi al cervello e al midollo spinale dovuti alle rapide accelerazioni o decelerazioni, che si verificano quando si cade o si riceve un colpo alla testa.

All'interno della struttura cerebrale vi sono delle cavità chiamate ventricoli contenenti a loro volta liquido cerebrospinale. Fra i ventricoli e il liquido cefalorachidiano che circonda il cervello non vi è soluzione di continuità. Le cavità encefaliche più grandi sono i ventricoli laterali, comunicanti con il terzo ventricolo lungo la linea mediana dell'encefalo. L'acquedotto cerebrale unisce il terzo al quarto ventricolo nel tronco encefalico, al di sotto del cervelletto. Il liquor è prodotto nei ventricoli laterali e nel terzo ventricolo dal plesso corioideo, costituito da formazioni peduncolate composte di vasi sanguigni sporgenti dalla parete ventricolare. Il liquido cerebrospinale è simile al sangue, essendo costituito da quello che appare un ultrafiltrato del plasma. In sostanza, si tratta di un liquido trasparente che contiene proteine, glucosio e ioni, soprattutto potassio, sodio e cloro. Il liquor circola lentamente dai ventricoli laterali e dal terzo ventricolo, attraverso l'acquedotto cerebrale, fino al quarto ventricolo e di qui fino allo spazio subaracnoideo che circonda l'encefalo, per essere poi riassorbito dai villi aracnoidei del seno sagittale, il grande sistema venoso situato fra i due emisferi, sulla superficie dorsale (figura 2, 1.2).

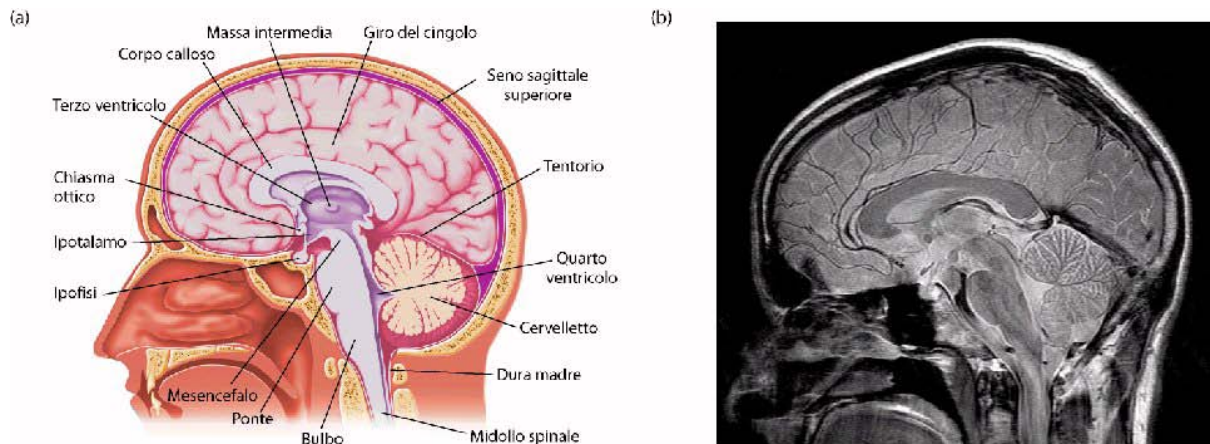


Figura 2 (componenti del Sistema Nervoso Centrale)

Per descrivere il "cervello", dobbiamo comprendere l'organizzazione del sistema nervoso che può essere suddiviso in due grandi porzioni: il sistema nervoso centrale (SNC), costituito dall'encefalo e dal midollo spinale, e il sistema nervoso periferico (SNP), costituito da tutte le strutture che non rientrano nel SNC (nervi periferici e gangli). Il SNC comprende tutte le parti di sistema nervoso poste all'interno delle ossa del cranio e del rachide. Il cervello è quindi la parte di SNC racchiusa all'interno del cranio. Le altre principali strutture del SNC sono costituite dal midollo spinale. I nervi entrano ed escono dal SNC. Una volta che questi nervi si sono portati al di fuori della copertura ossea del cranio e del midollo spinale, essi diventano parte integrante del SNP.

L'organizzazione cerebrale è eminentemente gerarchica. Il Proencefalo comprende il Telencefalo che a sua volta comprende i due emisferi cerebrali, Amigdala, Ippocampo, Gangli basali e Setto e il Diencefalo con Talamo, Ipotalamo ed epitalamo. Al di sotto c'è il Mesencefalo e il Romboencefalo con Bulbo, Cervelletto e Ponte. Diencefalo, Mesencefalo e Romboencefalo costituiscono il Tronco Encefalico.

Sebbene l'organizzazione anatomica sia gerarchica, la sua organizzazione operativa spesso non lo è. Porzioni cerebrali decisamente separate possono formare un' "alleanza" per eseguire particolari funzioni. Per esempio, siti specifici attraverso il cervello devono lavorare di concerto per dare un' interpretazione attendibile di ciò che i nostri sensi percepiscono e gran parte dello strato

esterno del cervello, la corteccia, sviluppa distinte unità operative sia in direzione orizzontale che verticale.

Il sistema nervoso è formato da due tipi principali di cellule: neuroni e cellule gliali. Oltre a condividere con tutte le altre cellule alcune caratteristiche, i neuroni hanno proprietà morfologiche e fisiologiche peculiari, grazie alle quali assolvono funzioni speciali. Le cellule gliali sono una classe di cellule non neurali che assolvono una funzione di sostegno, meccanico e trofico, del sistema nervoso. Il cervello è racchiuso all'interno di una struttura ossea protettiva, la scatola cranica, circondato dalla dura madre, uno strato ispessito formato da tessuto connettivale fibroso (collagene).

L'esame anatomico cerebrale a livello macroscopico, al di sotto della dura madre, rivela molte strutture particolarmente evidenti. Le circonvoluzioni, o giri cerebrali (le superfici arrotondate e sporgenti) e i solchi primari (le regioni infossate che appaiono come linee e pieghe) del cervello, il graduale assottigliarsi del tronco encefalico e l'elaborata struttura della corteccia cerebellare intensamente ripiegata

La dissezione del cervello lungo piani trasversali rivela la dicotomia fra sostanza (o materia) grigia e sostanza (o materia) bianca. La sostanza grigia forma un rivestimento corticale continuo, che avvolge una massa apparentemente omogenea di sostanza bianca. La sostanza grigia è così chiamata perché appare più scura e un po' grigiastria nei cervelli conservati, mentre in vivo il suo colore di solito varia dal rosato al rossastro, a causa dell'intensa vascolarizzazione; la sostanza grigia contiene i corpi cellulari dei neuroni e delle cellule gliali. La sostanza bianca è così chiamata perché nei tessuti conservati appare più chiara della materia grigia; in vivo è in effetti di un bianco latte. Il suo colore è dovuto alla mielina, la sostanza grassa che circonda gli assoni (figura 3,.1.2).

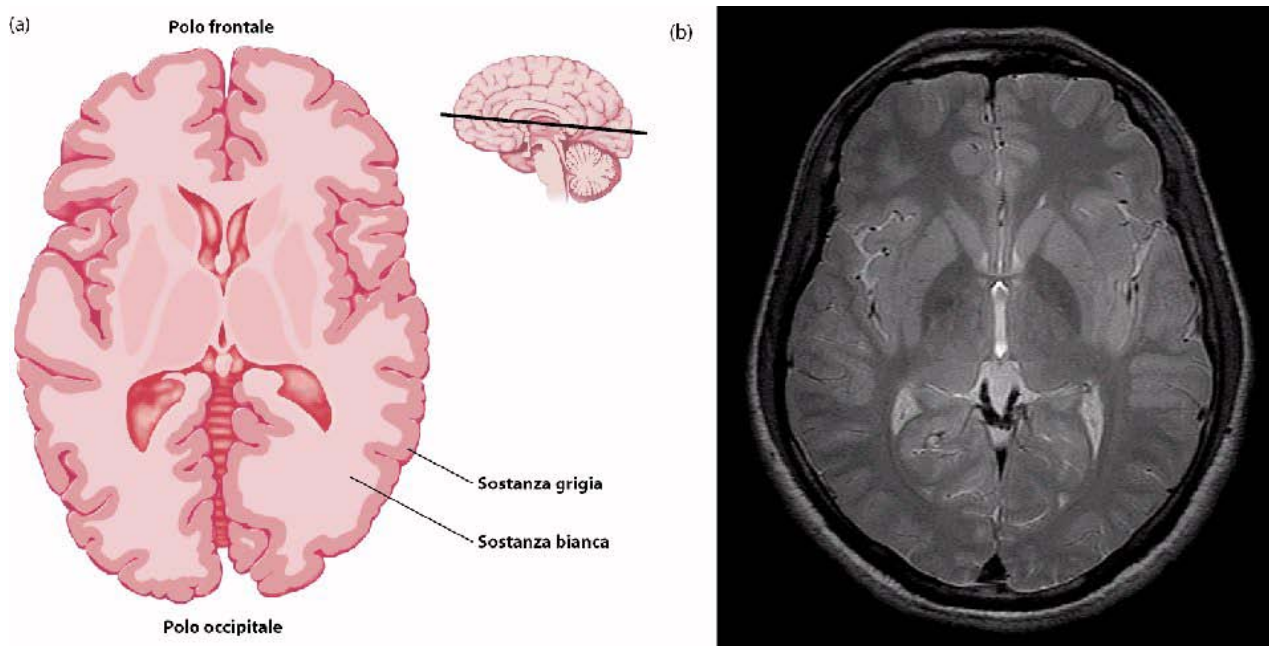


Figura 3 (dissezione del cervello: sostanza grigia di colore scuro e sostanza bianca di colore chiaro-RMN nella fig. a destra)

### 1.3 La corteccia cerebrale

La corteccia cerebrale comprende due emisferi simmetrici, formati da regioni mantellari costituite da neuroni organizzati (per massima parte) in strati.

Poggia sopra strutture profonde, che comprendono parti del sistema limbico e i gangli della base, mentre circonda le strutture del diencefalo. Nei mammiferi superiori e negli esseri umani presenta molte pieghe o circonvoluzioni. Le circonvoluzioni si distinguono ulteriormente in solchi (le regioni che si affossano, invaginandosi) e giri (le calotte superiori, arrotondate, del tessuto ripiegato, ovvero le parti visibili quando si osserva la superficie esterna degli emisferi). Nella specie umana le pieghe della corteccia assolvono uno scopo funzionale: aumentare la superficie corticale che può essere contenuta all'interno della scatola cranica. L'area totale della superficie della corteccia umana è di circa 2200-2400 cm<sup>2</sup> ma, grazie alle pieghe, circa due terzi di quest'area sono confinati nelle profondità dei solchi. Un altro vantaggio di avere una corteccia altamente ripiegata è

che i neuroni vengono a trovarsi più vicini tra loro nello spazio tridimensionale, con un notevole riduzione delle distanze che gli assoni devono coprire, quindi nel tempo necessario perché la conduzione nervosa lungo l'assone si trasmetta da una regione a un'altra. Questa economia/equilibrio a livello anatomico dipende dal fatto che gli assoni responsabili delle più lunghe connessioni cortico-corticali decorrono al di sotto della corteccia, nella sostanza bianca, senza seguire le invaginazioni della superficie nel loro percorso verso aree corticali distanti. Ripiegandosi, la corteccia porta inoltre regioni già vicine fra loro a essere ancora più vicine; per esempio, in ogni circonvoluzione la distanza lineare fra strati opposti della corteccia è inferiore rispetto a quella che si avrebbe se il giro fosse disteso e appiattito. Benché nella maggior parte delle regioni la corteccia sia composta da più strati di cellule, il suo spessore è in media di appena 3 mm, con un intervallo di variazione che va da 1,5 a 4,5 mm.

#### **1.4 Classificazione anatomo funzionale del sistema nervoso centrale**

Il cervello può essere suddiviso in Proencefalo, Mesencefalo e Romboencefalo. Al Proencefalo appartengono due strutture, il Telencefalo e il Diencefalo e per attinenza con la tesi di dottorato sarà analizzato con maggior dettaglio il Telencefalo, a cui vengono generalmente attribuiti i compiti delle funzioni intellettive "superiori": pensare, pianificare e risolvere i problemi.

### 1.4.1 Il Telencefalo e le sue parti.

Ogni emisfero cerebrale si suddivide in quattro regioni principali, o lobi, a cui se ne aggiunge un quinto quando si considera che il sistema limbico è talvolta denominato lobo limbico. I quattro lobi cerebrali sono il lobo frontale, il lobo parietale, il lobo temporale e il lobo occipitale. Il solco centrale (o scissura di Rolando) divide il lobo frontale dal lobo parietale e il solco laterale (chiamato anche scissura di Silvio) separa il lobo temporale dai lobi frontale e parietale. Il lobo occipitale è separato dai lobi parietale e temporale dal solco parieto-occipitale sulla superficie dorsale dell'encefalo e dall'incisura preoccipitale situata sulla superficie ventrolaterale (figura 4, 1.4.1).

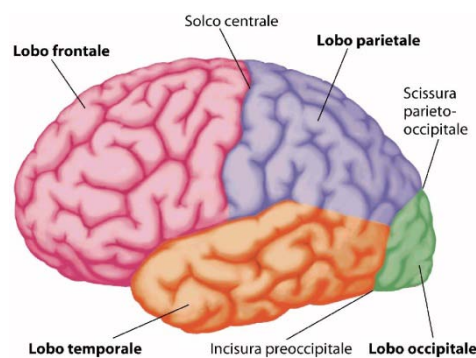


Figura 4 (suddivisione del cervello in 4 aree principali)

L'emisfero cerebrale destro è separato dal sinistro dalla scissura interemisferica (detta anche scissura longitudinale), che decorre dall'estremità rostrale a quella caudale del prosencefalo. Le interconnessioni fra i due emisferi cerebrali sono dovute a quegli assoni di neuroni corticali che attraversano il corpo calloso, la più grande commessura di sostanza bianca presente nel sistema nervoso (commessura è un termine specialistico, usato per indicare i tratti di sostanza bianca che passano trasversalmente da sinistra a destra, o viceversa, nel SNC). Il corpo calloso, letteralmente "corpo duro" per via della sua consistenza fibrosa, assolve importanti funzioni d'integrazione fra i due emisferi.



-Aree motorie del lobo frontale.

Il lobo frontale ha un ruolo molto importante nella progettazione e nell'esecuzione dei movimenti. Questo lobo si suddivide in corteccia motoria e corteccia prefrontale. La corteccia motoria comprende il giro precentrale, detto anche striscia motoria (area 4 di Brodmann), subito davanti al solco centrale. Il giro precentrale rappresenta la corteccia motoria primaria (area motoria 1, o M1. Figura 5, 1.4.1).

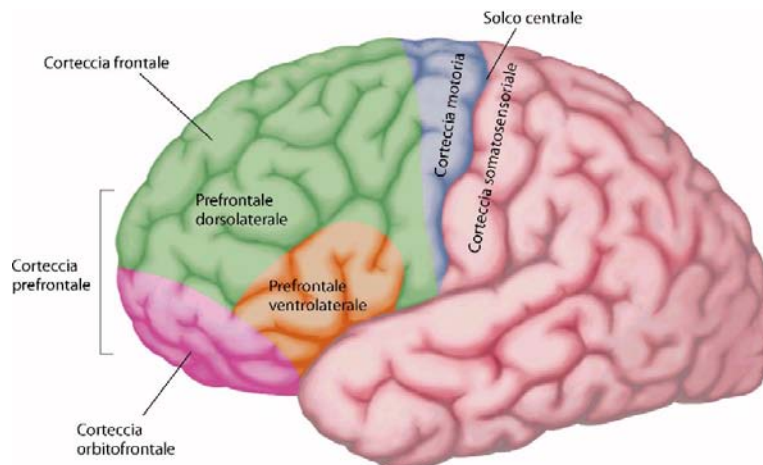


Figura 5 (aree motorie del lobo frontale)

Anteriormente a quest'area vi sono altre due importanti aree motorie corticali (nell' area 6 di Brodmann): la corteccia premotoria, sulla superficie laterale dell' emisfero, e la corteccia motoria supplementare, situata dorsalmente all'area premotoria ed estesa verso la superficie mediale dell'emisfero (figura 6, 1.4.1)

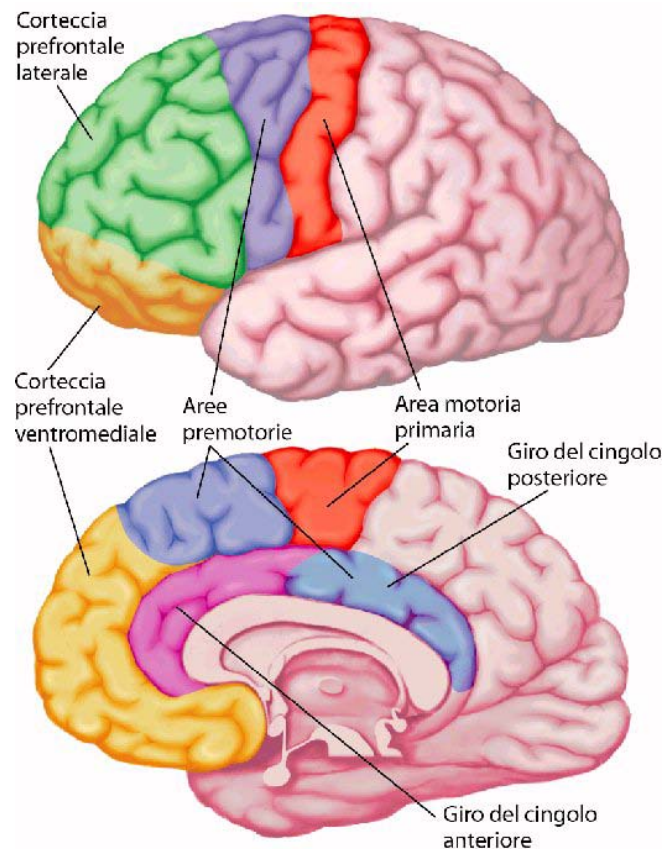


Figura 6 (corteccia premotoria e corteccia motoria supplementare)

Queste aree motorie sono composte di motoneuroni i cui assoni si prolungano fino al tronco encefalico e al midollo spinale, e tramite le sinapsi, infine, raggiungono i motoneuroni contenuti nel midollo.

I motoneuroni dello strato 5 della corteccia motoria (cellule di Betz), sono i più grandi della corteccia cerebrale, il loro corpo cellulare può infatti raggiungere un diametro di 60-80 micron, e sono l'origine delle principali vie discendenti dei segnali motori. La regione più anteriore del lobo frontale, la corteccia prefrontale, partecipa alle funzioni superiori del controllo motorio e della pianificazione e attuazione dei comportamenti, compiti che richiedono che le informazioni siano integrate nel tempo.

La corteccia prefrontale si suddivide in corteccia prefrontale dorsolaterale, situata sulla superficie laterale del lobo frontale davanti all'area premotoria e coinvolta nelle funzioni della

memoria di lavoro, corteccia orbitofrontale, nell'area frontale mediale, è localizzata sulla superficie antero-ventrale del lobo e si estende in senso mediale verso le strutture del lobo limbico, su cui proietta fibre di interconnessione e corteccia cingolata anteriore.

-Aree somatosensoriali del lobo parietale.

La corteccia somatosensoriale è localizzata nel giro postcentrale e nelle aree adiacenti (aree 1, 2 e 3 di Brodmann. Figura 6, 1.4.1).

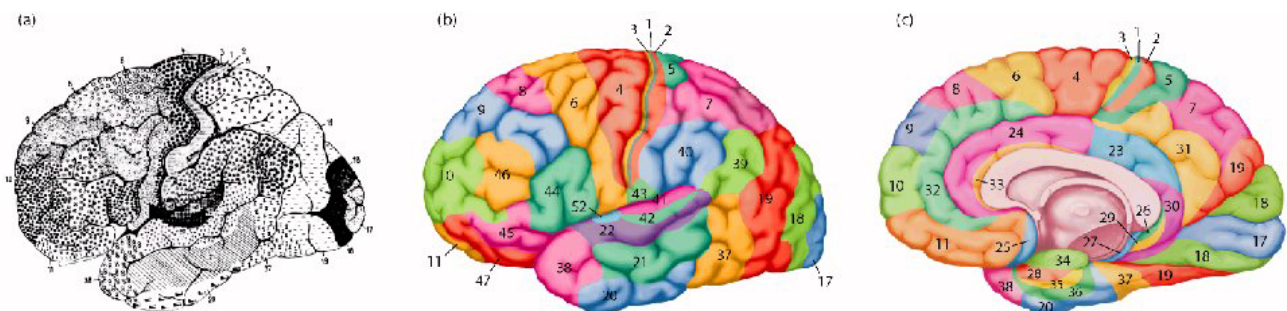


Figura 6 (corteccia somatosensoriale -1,2,3- in base alla classificazione di Brodmann)

Queste regioni corticali ricevono fibre provenienti da relè somatosensoriali situati nel talamo, afferenze che veicolano l'informazione relativa alla sensibilità tattile, dolorifica e termica e alla propriocezione degli arti (il senso della posizione. Figura 7, 1.4.1).

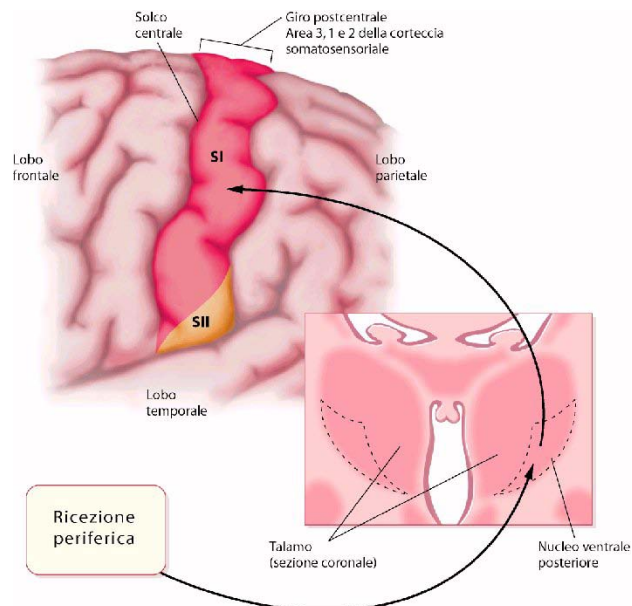


Figura 7 (il talamo veicola l'informazione dalla periferia a S1)

La corteccia somatosensoriale primaria (o S1) è immediatamente posteriore al solco centrale; ventralmente alla S1 si trova la corteccia somatosensoriale secondaria (S2), che riceve le informazioni attraverso proiezioni provenienti soprattutto dall'area S1. Dalle regioni S1 e S2 hanno origine proiezioni somatosensoriali alla corteccia parietale posteriore. L'informazione somatosensoriale che giunge al talamo e da qui va alla corteccia somatosensoriale primaria, segue due vie principali: il sistema anterolaterale per la sensibilità termica e dolorifica, e il sistema colonna dorsale - lemnisco mediale, per le informazioni relative al tatto, alla propriocezione e al movimento.

-Aree dell'elaborazione visiva nel lobo occipitale.

La corteccia visiva primaria (chiamata anche corteccia striata VI o area 17 di Brodmann) riceve l'informazione visiva ritrasmessa dal relè costituito dal nucleo genicolato laterale del talamo.

Negli esseri umani la corteccia visiva primaria è localizzata soprattutto sulla superficie mediale degli emisferi cerebrali nella scissura tra i due emisferi (figura 9, 1.4.1).

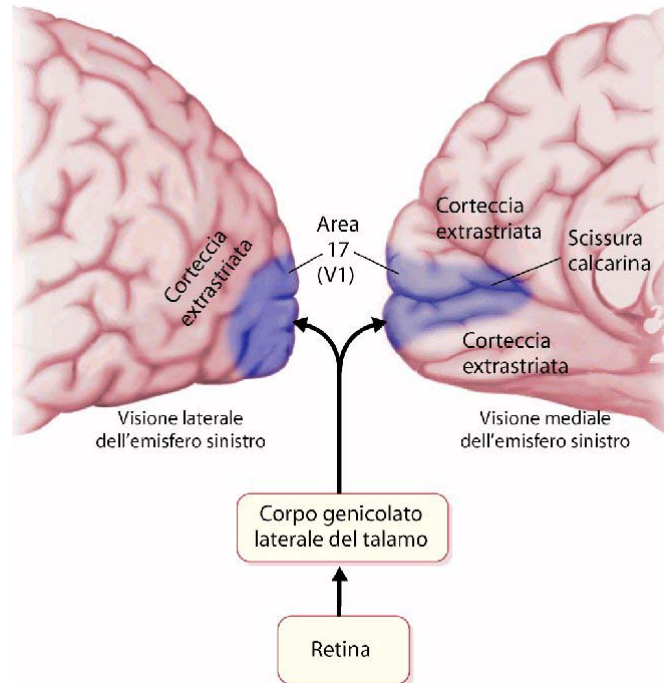


Figura 9 (corteccia visiva primaria)

E' composta di sei strati e dà inizio alla codifica corticale delle caratteristiche fisiche degli stimoli visivi, quali colore, luminosità, frequenza spaziale, orientamento e movimento (figura 10, 1.3.1).

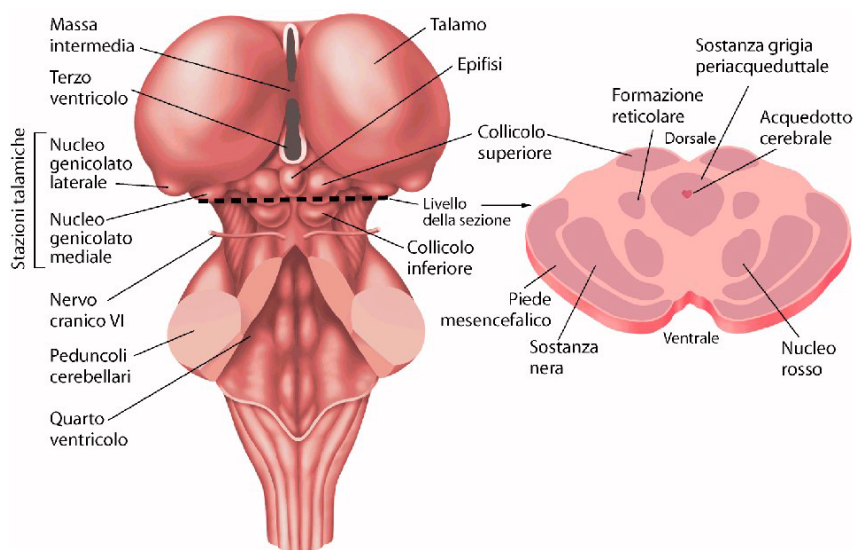


Figura 10 (strati della corteccia visiva primaria)

L'informazione visiva è trasmessa attraverso il nervo ottico al nucleo genicolato laterale del talamo e di qui all'area VI, lungo una via spesso chiamata retino-genicolo-striata o via ottica primaria. Altre informazioni provenienti dalla retina, attraverso proiezioni secondarie, raggiungono regioni subcorticali, soprattutto il collicolo superiore del mesencefalo, che prende parte alle funzioni visuo-motorie, come i movimenti oculari (figura 11, 1.4.1).

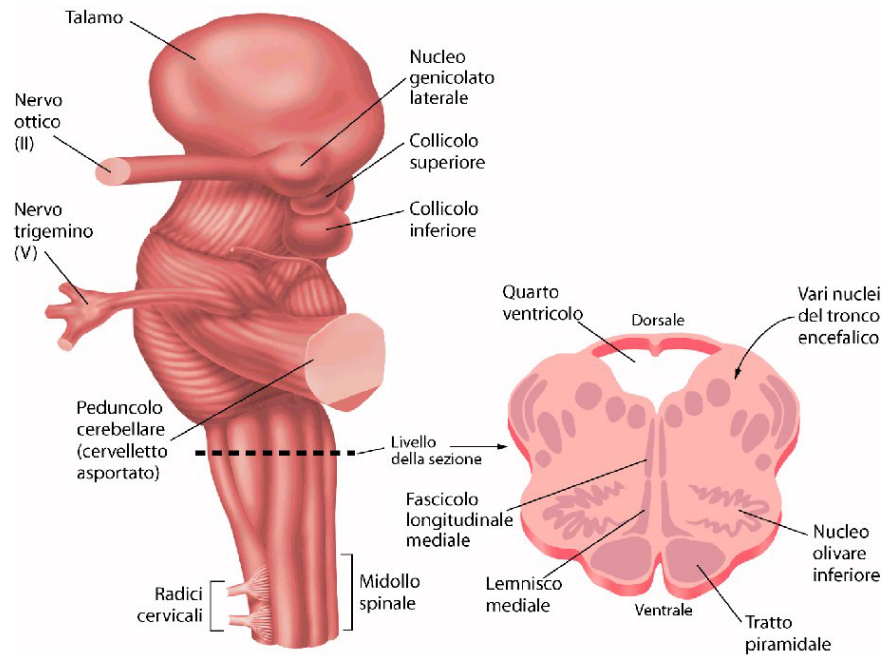


Figura 11 (canalii visuo-motori)

Intorno alla corteccia striata vi è un'area piuttosto estesa, detta corteccia visiva extrastriata (extra significa all'esterno, al di fuori); comprende le aree 18 e 19 di Brodmann con circa tre dozzine di aree visive distinte. Tali aree contengono mappe spaziali del mondo reale parzialmente ridondanti, ognuna specializzata nell'analisi di particolari aspetti della scena visiva, per esempio il colore, il movimento, la posizione o la forma degli oggetti (figura 12, 1.4.1).



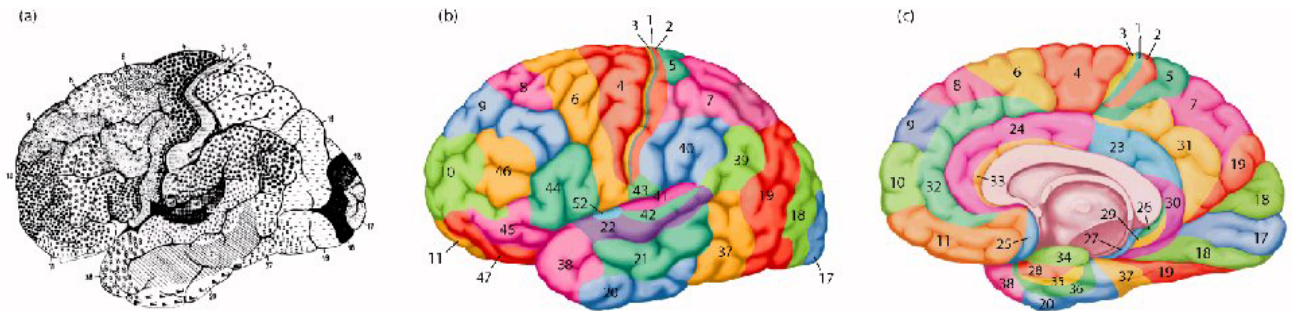


Figura 12 (corteccia visiva extra striata –aree 18, 19 di Brodmann)

Due importanti vie veicolano l'informazione visiva dalla corteccia striata alle regioni extrastriate.

Una via corre dall'area VI al lobo temporale (la via ventrale o via "what", via del "che cosa"), l'altra via si proietta da VI al lobo parietale (via dorsale o via "where", via del "dove"). La prima, via del "cosa", corrisponde al flusso d'informazione derivante dall'analisi delle caratteristiche dello stimolo e delle loro reciproche relazioni; quest'informazione viene utilizzata per discriminare la forma e identificare l'oggetto. La seconda via, del "dove", veicola l'informazione relativa al movimento e alla posizione dello stimolo nello spazio visivo. Ognuna delle numerose aree extrastriate ha forti interconnessioni neurali con le aree che la precedono nella gerarchia visiva (connessioni reciproche) e con le altre aree che fanno parte dello stesso canale di flusso. Inoltre, tra i due flussi d'informazione visiva – il dorsale e il ventrale – vi sono numerose interconnessioni (figura 13, 1.4.1).

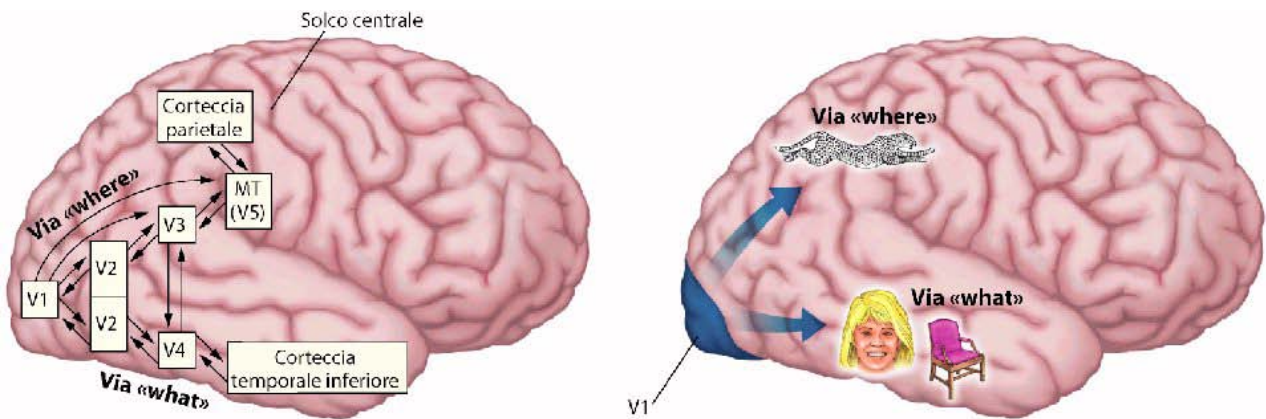


Figura 13 (vie dell'informazione visiva: dalla corteccia striata alle regioni extrastriate)

-Aree dell'elaborazione uditiva nel lobo temporale.

La corteccia uditiva si trova nella parte superiore del lobo temporale, sepolta in profondità nella scissura di Silvio (o solco laterale. Figura 14, 1.4.1).

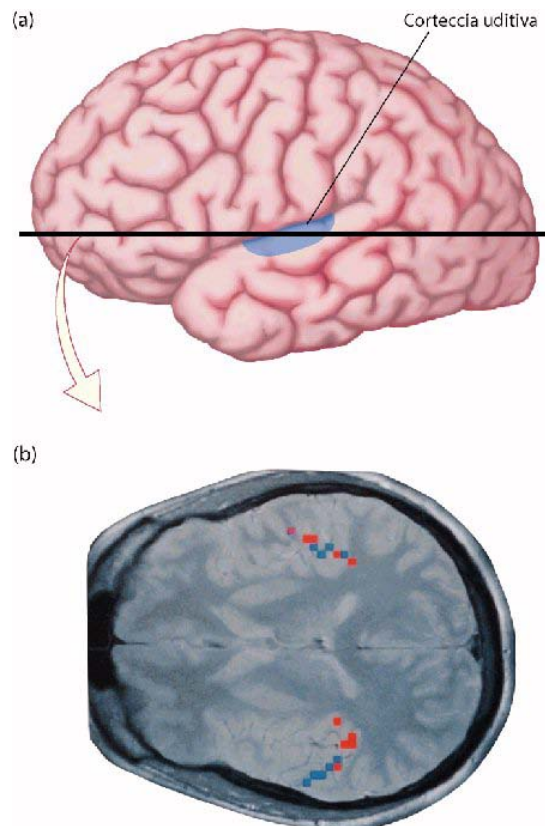


Figura 14 (corteccia uditiva)



La proiezione che ha origine dalla coclea (l'organo uditivo localizzato nell'orecchio interno) si trasmette attraverso stazioni subcorticali al nucleo genicolato mediale del talamo e di qui alla corteccia sovratemporale, una regione nota come giro temporale trasverso di Heschl. Tale regione rappresenta A1, la corteccia uditiva primaria, e A2, l'area uditiva di associazione situata sia intorno che posteriormente ad A1 (aree 41 e 42 di Brodmann). L'area 22, che circonda la corteccia uditiva, contribuisce alla percezione degli stimoli acustici; negli esseri umani la stimolazione di quest' area produce sensazioni sonore.

-Corteccia associativa.

Le porzioni di neocorteccia che non hanno funzioni sensoriali o motorie costituiscono la corteccia associativa, composta da regioni che ricevono impulsi relativi a una o più modalità. Queste regioni assolvono specifici compiti funzionali, che non sono esclusivamente sensoriali o motori. Per esempio, le regioni di associazione visiva nella corteccia dei lobi parietale e temporale, sono essenziali per la corretta percezione del mondo visivo; le aree associative nella regione di congiunzione parieto-temporo-occipitale dell' emisfero sinistro hanno un ruolo essenziale nell'elaborazione del linguaggio, mentre nell'emisfero destro questa stessa regione è implicata nell'orientamento dell'attenzione. I processi mentali superiori perciò dipendono dalle aree corticali associative, tramite l'interazione con le aree motorie e sensoriali della corteccia (figura 15 1.4.1)

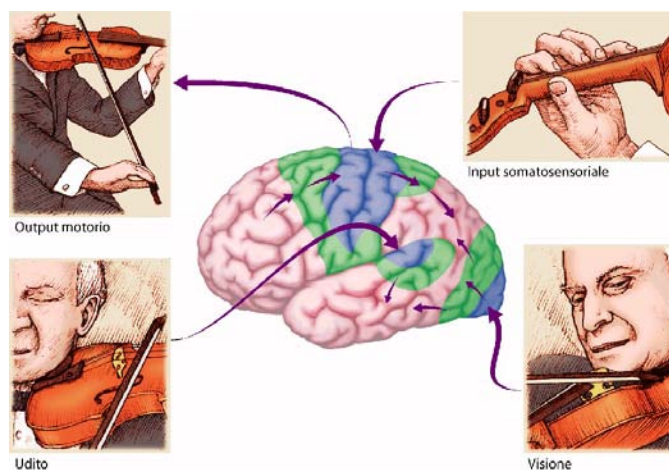


Figura 15 (interazione tra aree associative, motorie e sensoriali)

### **1.4.2 Corteccia cerebrale: breve ripasso sulle principali caratteristiche.**

I due grossi emisferi simmetrici costituiscono la corteccia cerebrale. La corteccia di ogni emisfero è ulteriormente suddivisa in quattro sezioni, o lobi, da incavi profondi detti solchi. Il lobo occipitale è la parte più bassa del cervello, e si trova vicino all'osso occipitale. L'incisura preoccipitale lo delimita dal lobo temporale in basso e la scissura parieto-occipitale, dal lobo parietale in alto. Contiene i centri responsabili della vista. Il lobo parietale si trova nella parte superiore dell'encefalo. Il solco centrale (scissura di Rolando) lo delimita dal lobo frontale e il solco laterale (scissura di Silvio), dal lobo temporale. È l'area in cui si ricevono le sensazioni del tatto e le informazioni sullo spazio e l'orientamento. Il lobo temporale si trova vicino alle tempie. Contiene i centri dell'udito, dell'olfatto e della memoria. Il lobo frontale è la parte anteriore (frontale) dell'encefalo, ed è suddiviso in giro frontale superiore, medio e inferiore, a ridosso della scissura di Silvio. È responsabile della coordinazione motoria volontaria. Ospita i centri di controllo dei muscoli del corpo e dei movimenti coordinati e ritmici di testa e collo, come masticare, leccare e ingoiare. Il lobo frontale contiene anche i centri che controllano la memoria, il ragionamento e le associazioni di concetti e forse anche l'essenza della personalità.

Sotto la corteccia si trovano regioni più piccole del telencefalo: l'amigdala, o complesso amigdaloideo (così chiamato per il suo aspetto a forma di noce), l'ippocampo (così chiamato perché ha la forma di un cavalluccio marino), i gangli basali e il setto (così detto perché forma una parete fra due delle cavità cerebrali riempite di liquido, detti ventricoli). L'amigdala, l'ippocampo, i gangli basali e il setto funzionano di concerto e contribuiscono alla regolazione dell'emozione, della memoria e di determinati aspetti del movimento. Tutti insieme formano quello che è chiamato il sistema limbico.

### **1.4.3 Il Diencefalo. e le sue parti**

Costituito dal talamo, l'ipotalamo ed epitalamo. Tutte queste strutture contengono aree ben definite. Specifici campi o nuclei talamici fungono da stazioni di relais per quasi tutte le informazioni che provengono o pervengono al proencefalo. Specifici campi o nuclei ipotalamici fungono da stazioni di relais per i sistemi di regolazione interna, monitorando le informazioni che gli provengono dal sistema nervoso autonomo e controllando il corpo mediante tali nervi e l'ipofisi (organo in grado di secernere ormoni, sostanza che viene riversata direttamente nel torrente circolatorio al fine di regolare l'attività cellulare di altri organi). L'Ipotalamo è responsabile di molte funzioni, come il sonno e la veglia, gli istinti sessuali, la fame e la sete.

Controlla anche l'attività endocrina regolando il lavoro dell'ipofisi e svolge un ruolo importante nelle emozioni di dolore e piacere. L'ipofisi è una piccola ghiandola attaccata all'ipotalamo. Questa ghiandola secerne ormoni che regolano le altre ghiandole endocrine controllando crescita, riproduzione e numerosi processi metabolici. L'epitalamo consiste nella ghiandola pineale e nel plesso coroideo che serve alla produzione del fluido cerebrospinale.

### **1.5 Il Mesencefalo e le sue parti**

E' la porzione più piccola delle principali porzioni che costituiscono il cervello, posta tra il ponte (struttura del romboencefalo) e il diencefalo. Sulla sua superficie più esterna si trovano due paia di piccole elevazioni (collicoli), raggruppamenti di cellule che trasportano specifiche informazioni sensitive dagli organi di senso al cervello. Le due più vicine al ponte, che costituiscono il collicolo inferiore, sono deputate all'elaborazione delle informazioni uditive e le due più vicine al talamo, quelle del collicolo superiore, sono deputate alle informazioni visive.

## 1.6 Il Romboencefalo e le sue parti

Le due parti principali del romboencefalo sono il ponte, il midollo allungato (o bulbo) e il cervelletto. Le strutture poste all'interno del ponte, del bulbo e del cervelletto generalmente interagiscono, a parte qualche eccezione, con le strutture telencefaliche tramite interconnessione diencefalica. Il termine troncoencefalo include tutte le strutture del romboencefalo più il mesencefalo e il diencefalo. Il cosiddetto "tronco" contiene, di fatto, tutte le connessioni tra la corteccia cerebrale e il midollo spinale. Il tronco encefalico agisce automaticamente per controllare funzioni corporee vitali quali la respirazione o la pressione arteriosa. È un peduncolo di cellule e fibre nervose, lungo circa sette centimetri, che collega la parte superiore del midollo spinale con il cervello. Il midollo allungato o bulbo è la parte più bassa del tronco encefalico e serve da connessione tra il cervello e il midollo spinale. Il ponte è situato nel tronco encefalico, verticalmente tra il mesencefalo e il midollo allungato e trasversalmente tra il cervelletto e l'ipofisi.

Funziona da ponte, appunto, di connessione tra il cervello, il cervelletto e il midollo allungato. Dal momento che collega diverse parti dell'encefalo, il ponte è in grado di facilitare la coordinazione delle funzioni dei due lati del corpo così come di quelle della faccia e della mandibola. Le radici del quinto, fino all'ottavo paio di nervi encefalici originano in corrispondenza del ponte.

Il cervelletto è una porzione dell'encefalo localizzata nella parte posteriore dello stesso, sotto i due emisferi cerebrali. Il cervelletto è formato da una zona centrale, detta verme, e da due zone laterali, o emisferi, una per lato. È compito del cervelletto coordinare e modificare l'attività risultante dagli impulsi e dagli ordini inviati dal cervello; è in grado di farlo ricevendo informazioni dalle terminazioni di tutto il corpo, come per esempio dai centri del bilanciamento e dell'equilibrio localizzati nell'orecchio interno. Il cervelletto coordina e perfeziona i movimenti del corpo inviando impulsi regolatori ai motoneuroni dell'encefalo e del midollo spinale. La lesione di quest'organo si manifesta dunque con la perdita della capacità di mantenere una precisa coordinazione muscolare e

di eseguire movimenti precisi nell'ambito di un processo motorio (sviluppo continuo che implica molti cambiamenti).

## **Capitolo 2**

### **Sviluppo del cervello**

Il sistema nervoso umano è responsabile dell'invio, della ricezione e dell'elaborazione degli impulsi nervosi. Tutti i muscoli e gli organi del corpo funzionano in risposta a stimoli nervosi. Tre sistemi cooperano per espletare le funzioni del sistema nervoso: il sistema centrale, quello periferico e quello autonomo.

Di tutte queste componenti, la principale è l'encefalo, che occupa la cavità cranica. Senza la sua membrana protettiva più esterna, la dura madre, l'encefalo pesa in media 1,4 chilogrammi, che rappresentano circa il 97% dell'intero sistema nervoso centrale. L'encefalo è connesso con la porzione terminale superiore del midollo spinale (a cui si collega attraverso il forame magno del cranio)

Nonostante la difficoltà di stabilire la relazione tra pre-definito e appreso, è sempre più comune ritenere che la complessità del cervello umano derivi dall'interazione tra fattori genetici ed ambientali e che non sia solo il mero e passivo esplicarsi di processi genetici. Ciò significa che dotazione genetica ed esperienza co-determinano lo sviluppo, influenzandosi reciprocamente in un processo di interazione dinamica (Gottlieb, 2001).

Parlando del cervello e delle sue relazioni con lo sviluppo comportamentale Johnson (2000; 2001) sostiene sia possibile avanzare tre diverse ipotesi: la prima di tipo "maturazionale", la seconda legata all'apprendimento ed una di "specializzazione interattiva". L'ipotesi "maturazionale" assume che particolari regioni del cervello si sviluppino nel tempo e che questo permetta l'apparire di nuove funzioni sensoriali, motorie e cognitive, quindi il successo in nuovi compiti comportamentali ad una determinata età è attribuito alla maturazione di nuove regioni cerebrali. L'ipotesi "dell'apprendimento" ritiene, invece, che i cambiamenti nel modo in cui il bambino elabora le informazioni siano il risultato di un complesso processo di apprendimento percettivo e motorio. Infine l'autore propone un'ipotesi di "specializzazione interattiva" e afferma l'esistenza di strutture neuroanatomiche programmate geneticamente in cui organizzazione e funzionamento siano parzialmente modificati da input esterni ed interni.

Questa ipotesi alternativa si basa sull'assunto che lo sviluppo funzionale del cervello, dopo la nascita, è parte di un processo di organizzazione interattiva intra e inter regionale. Secondo questa visione le vie corticali differiscono tra loro per il tipo di influenza che hanno verso le altre strutture del cervello e per le loro predisposizioni ad elaborare diverse informazioni. Queste iniziali predisposizioni sono sufficienti per assicurare che inizialmente tutti gli input ed output sensoriali siano elaborati da un certo numero di vie corticali che solo in seguito verranno reclutate per

compiere particolari funzioni (Elmanet al. 1996). Durante lo sviluppo, queste vie e queste strutture affrontano un processo quindi di specializzazione, nel senso che una determinata regione corticale diviene progressivamente sempre più selettiva nelle sue proprietà di risposta; ad esempio, se alcune aree corticali di un neonato possono rispondere ad un'ampia varietà di stimoli e prove, attraverso la specializzazione queste stesse aree potranno rispondere solo ad una particolare e più ristretta classe di stimoli. Inoltre, all'aumentare dell'età dei soggetti e dell'esperienza con determinati stimoli, aumenta anche la localizzazione dell'elaborazione. Inoltre, le vie che si stanno specializzando potrebbero inibire altre vie creando una vera e propria competizione tra quale sia la più adatta anche se fortemente influenzata dalle stimolazioni precoci. Secondo l'ipotesi della specializzazione interattiva (Johnson 2001) l'acquisizione di una nuova abilità durante lo sviluppo, non è dovuta all'emergere di una nuova struttura, ma piuttosto alla riorganizzazione delle interazioni tra le strutture già esistenti e parzialmente attive. Per questo motivo, è possibile che le regioni che un neonato attiva in un particolare compito siano diverse da quelle di un adulto.

## **2.1 Sviluppo postnatale del cervello: differenze tra cervello adulto e cervello del neonato**

Nell'adulto l'encefalo pesa in media 1,4 chilogrammi, che rappresentano circa il 97% dell'intero sistema nervoso centrale.

Alla nascita il peso dell'encefalo umano è in media il 25 % di quello che sarà nell'adulto. A sei mesi esso raggiunge dimensioni pari al 50 % e a due anni del 75 % rispetto a quello dell'adulto. Dal momento che, dopo la nascita, non viene creato nessun nuovo neurone, l'aumento dimensionale dell'encefalo viene spiegato con un aumento delle dimensioni dei neuroni già presenti e con l'aumento delle connessioni che essi effettuano emettendo nuove ramificazioni assoniche e dendritiche. Una certa quota di tale aumento dimensionale spetta alla creazione di nuove cellule gliali e alla crescita di guaine mieliniche che vanno a rivestire numerosi neuroni. Dopo la nascita comunque, all'influenza determinata dal programma genetico di ogni individuo si associa quella derivante dall'ambiente e dall'esperienza, cosicché ogni singolo encefalo risulterà leggermente diverso da tutti gli altri. È infatti noto che l'esperienza influisce sullo sviluppo del cervello: i processi di integrazione cerebrale sensitivi e cognitivi danno luogo alla formazione di sinapsi e alla crescita di dendriti. La struttura dell'encefalo si sviluppa durante il nono mese di vita prenatale e probabilmente ancora per uno o due mesi dopo la nascita, cosicché può sembrare che gli esseri umani vengano alla luce quando ancora la loro formazione non è del tutto completata. Dopo la nascita ciò che in realtà si sviluppa è la mente. Alla nascita il cervello è pronto a mettere in funzione numerosissimi sistemi come la regolazione del battito cardiaco, della respirazione o della

temperatura corporea. Ma lo sviluppo della mente richiede che si verifichi un'interazione dell'organismo con l'ambiente sia esso fisico, intellettuale, emotivo o sociale. Il cervello umano è ben preparato a svolgere questo tipo di interazioni funzionali. L'esperienza con il mondo esternomodellerà e rafforzerà determinate connessioni e determinati circuiti. Il cervello è preparato a percepire le informazioni visive, acustiche, gustative e olfattive ed è preparato a ricordarle. Man mano che il cervello si sviluppa è sempre più pronto a comparare le nuove informazioni visive o acustiche con quelle che ha già immagazzinato nella sua memoria, così da poterle raggruppare sulla base di comuni caratteristiche. È in questo modo che il cervello apprende e dà forma alla mente.

## 2.2 Sviluppo prenatale del cervello

Un ovulo impiega circa tre giorni per scendere lungo l'ovidotto. Dopo la fecondazione incomincia il processo di segmentazione: l'ovulo, che a questo punto viene chiamato zigote, incomincia a dividersi. La prima divisione avviene dopo 30 ore dalla fecondazione, la seconda dopo 60. Successivamente si formano 8, 16, ecc. cellule (**morula**). L'embrione è una sfera, **blastula**, contenente cellule tutte eguali tra loro (figura 1, 2.2).

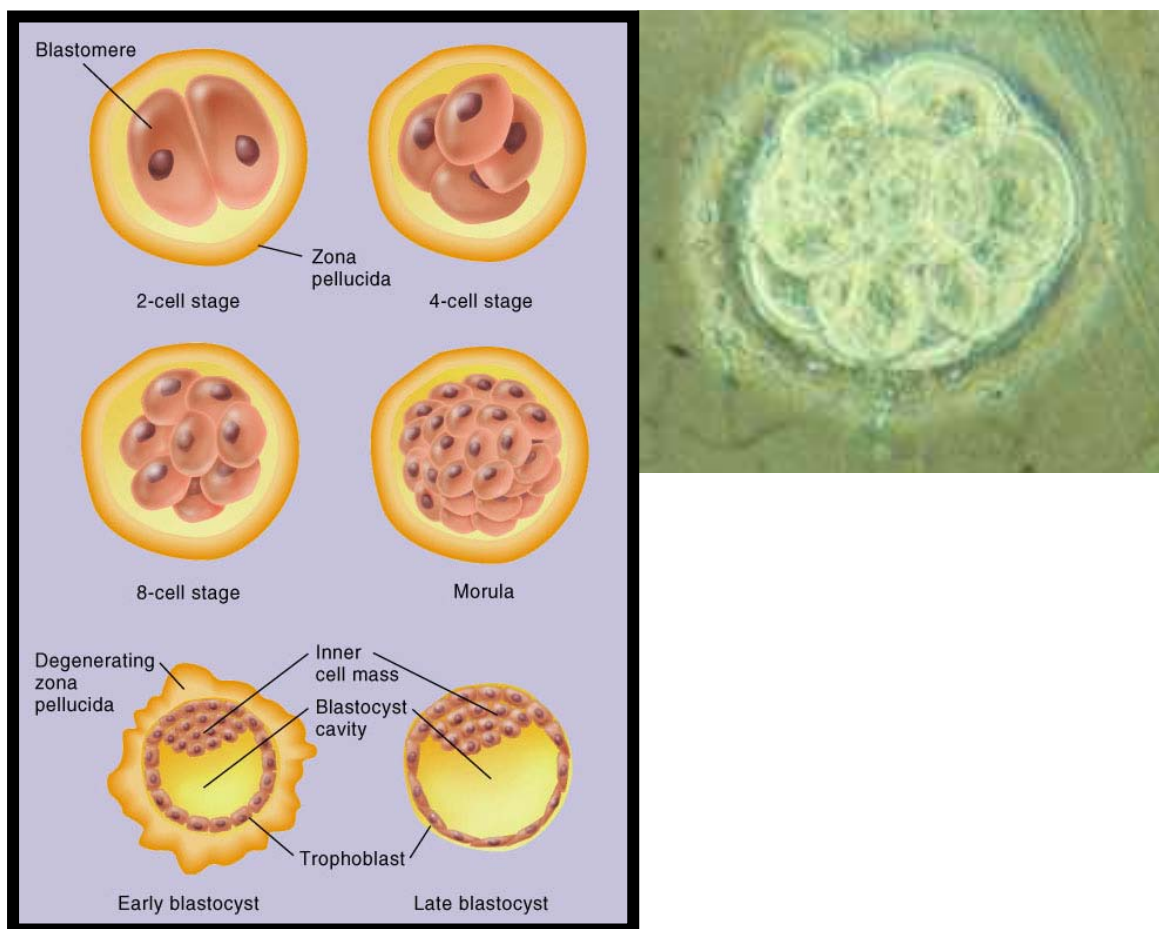


Figura 1 (segmentazione dell'ovulo)



La morula darà origine ad una sfera cava, detta **gastrula**, dalla quale si differenzieranno le cellule che formeranno l'embrione vero e proprio; altre cellule serviranno per mantenere i contatti con la parete uterina. Il processo di gastrulazione porta alla formazione di un abbozzo di essere vivente e mette a contatto tra loro le cellule destinate a formare le diverse parti dell'embrione.

Attraverso il meccanismo di **induzione** un gruppo di cellule fanno in modo che altre si organizzino in un determinato modo: viene così stabilito il piano organizzativo dell'intero organismo.

La gastrulazione dà origine allo sviluppo dell'embrione di tre strati di cellule o **foglietti embrionali**: il **foglietto ectodermico**, quello **endodermico** e quello **mesodermico**, che vengono a situarsi rispettivamente all'esterno, all'interno e in mezzo ai primi due.

L'**ectoderma** dà origine alla pelle e al sistema nervoso; l'**endoderma** al rivestimento interno del tubo digerente e a molti organi, come i polmoni, il fegato e le ghiandole salivari; il **mesoderma** dà origine ai muscoli, alle ossa, al tessuto connettivo, al sangue, agli organi dell'apparato riproduttivo e dell'apparato escretore (Fig. 2, 2.2).

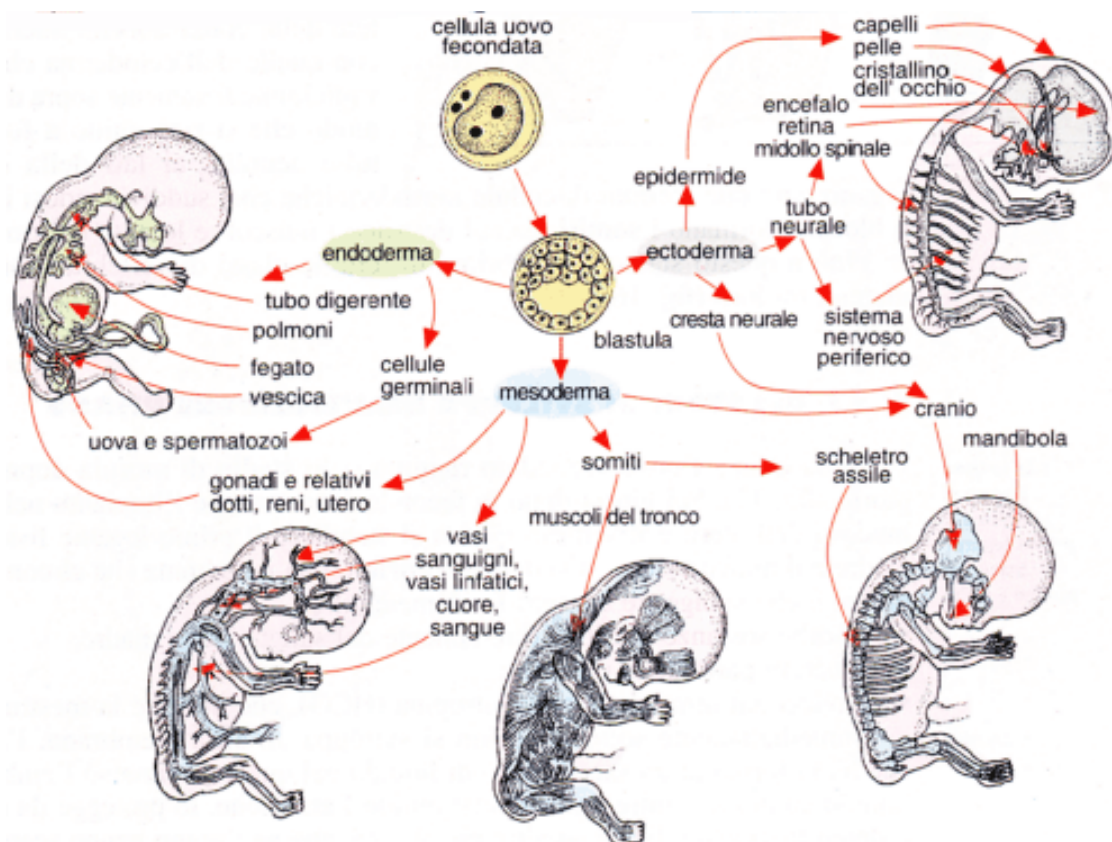


Figura 2 (sviluppo embrionale)

Il sistema nervoso comincia con il processo di Neurolazione (figura 3a, 3b, 2.2)

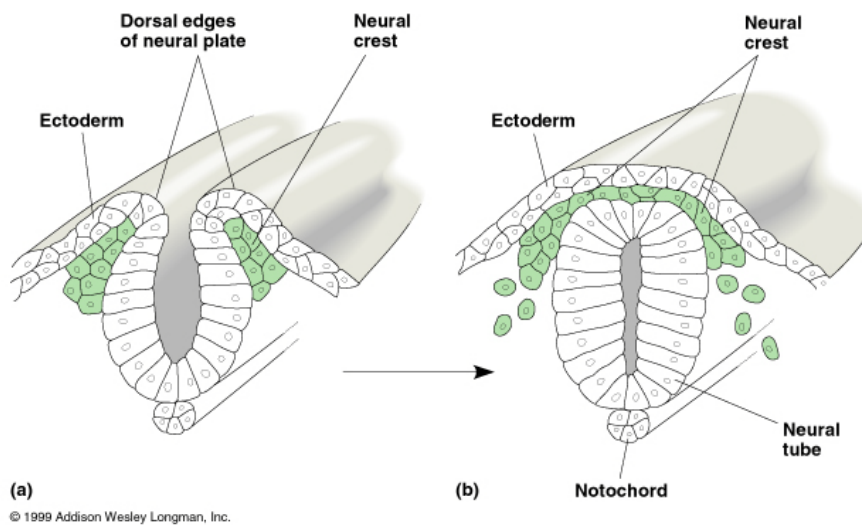


Figura 3°,b (Neurolazione: formazione del sistema nervoso)

Una porzione dell'ectoderma comincia a ripiegarsi su se stesso e a formare un cilindro chiamato Tubo Neurale (figura 4, 2.2)

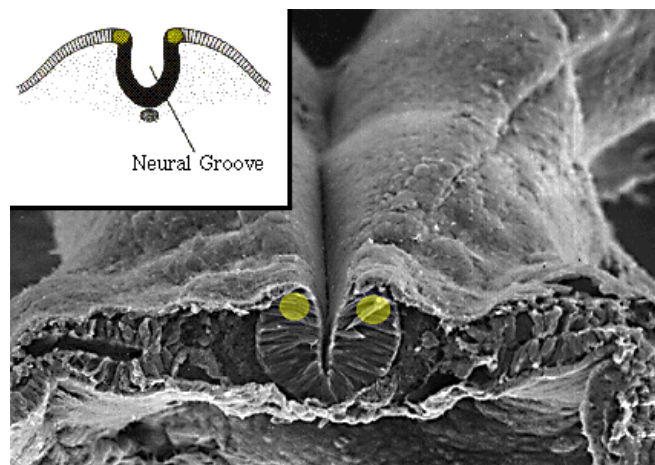


Figura 4 (formazione del tubo neurale)

Il tubo neurale si differenzia lungo tre dimensioni: lunghezza, circonferenza e raggio.

1) Lungo la dimensione della lunghezza avvengono le maggiori suddivisioni del sistema nervoso centrale con il "forebrain" o prosencefalo (emisfero dx e sx + talamo ed ipotalamo) ed il "midbrain" o mesencefalo (tetto) da una parte e la corda spinale dall'altra (figura 5, 2.2) .

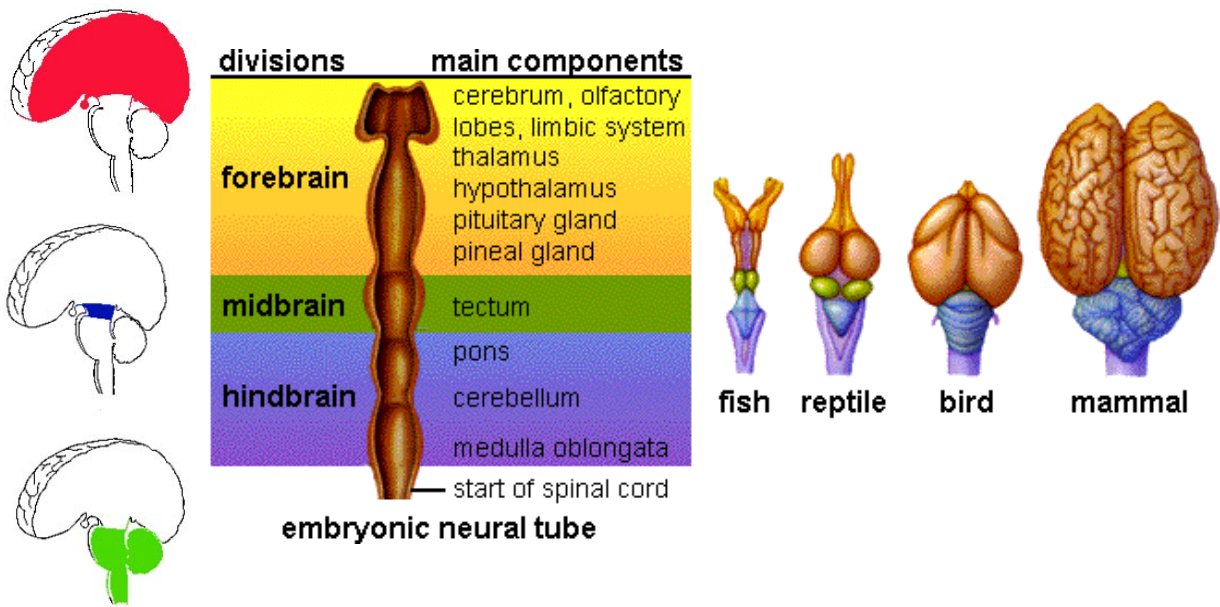


Figura 5 (differenziazione del tubo neurale)

Si organizza in una serie di curve e circonvoluzioni. Dopo circa 5 settimane dal concepimento queste curve possono essere identificate come le principali componenti del cervello dei mammiferi (figura 6, 2.2)

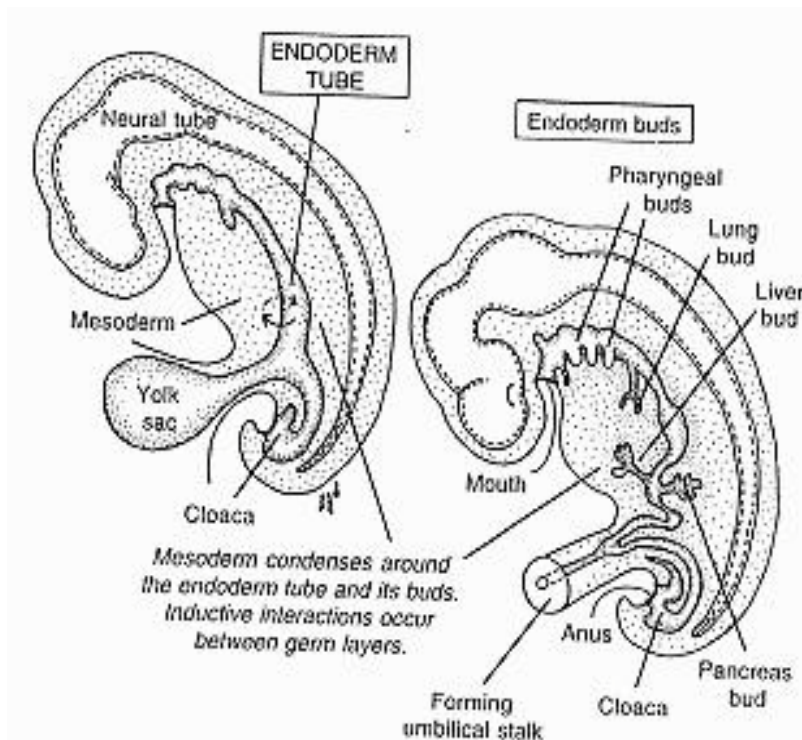


Figura 6 (evoluzione del tubo neurale)

Dalla prima curva deriva la corteccia (telencefalo)

Dalla seconda ha origine il talamo e l'ipotalamo (diencefalo)

Dalla terza curva il midbrain (mesencefalo- connessione tra i nervi ed i nuclei sensoriali)

Dalle successive curve originano cervelletto e midollo

Vedi figura 7, 2.2.

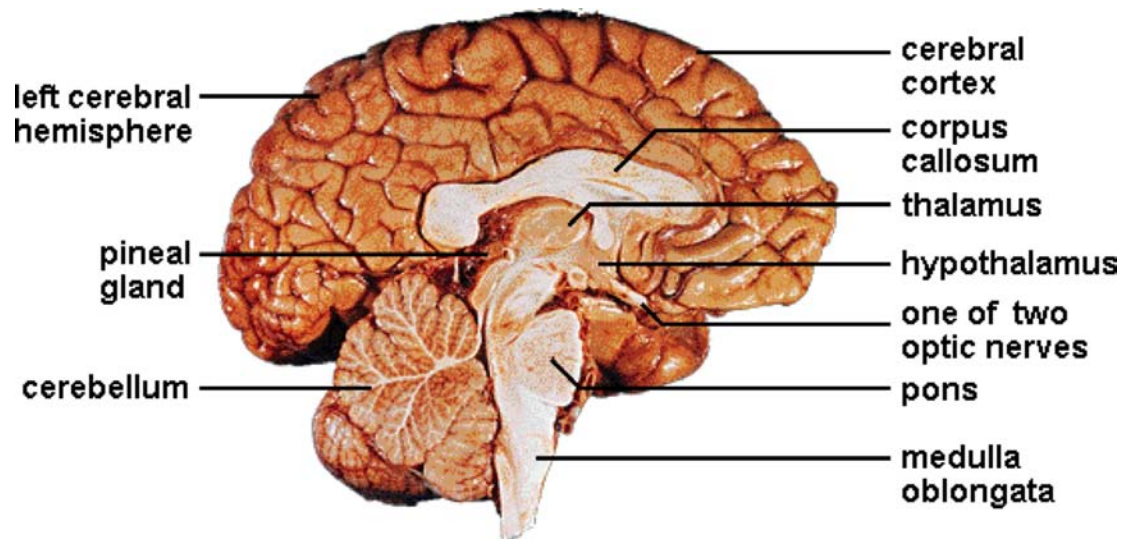


Figura 7 (formazione del sistema nervoso centrale)

La figura che segue mostra lo sviluppo fetale ed embrionale del cervello umano (figura 8, 2.2).

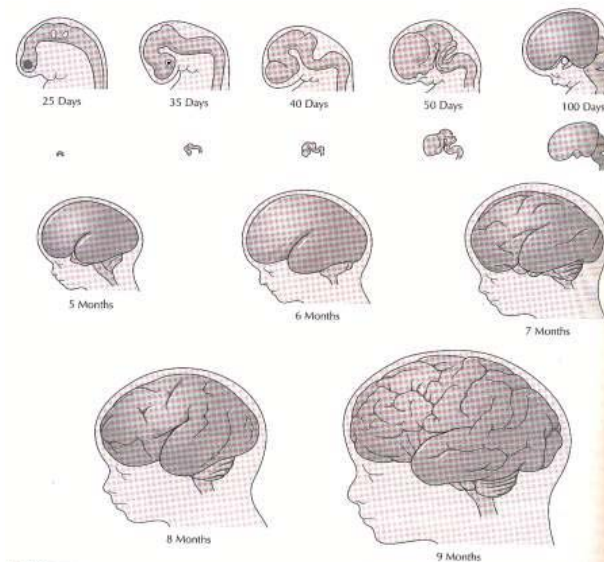


Figura 8 (sviluppo fetale ed embrionale del cervello)



La figura che segue mostra la visione laterale del cervello umano a diverse fasi dello sviluppo fetale (1/3 della grandezza reale). Notare la graduale emergenza dei giri e dei solchi (figura 9, 2.2)

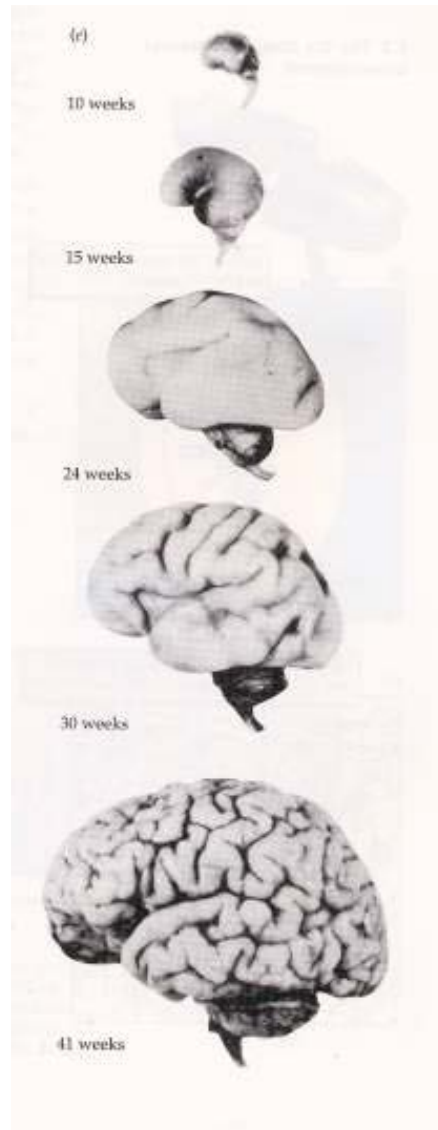


Figura 9 (fase dello sviluppo cerebrale)

2) la seconda dimensione su cui si differenzia il tubo neurale è quella della circonferenza.

La dimensione della circonferenza (tangente alla superficie) è critica per la distinzione tra sistemi sensoriali e sistemi motori: la parte dorsale (alta) corrisponde alla corteccia sensoriale e quella ventrale corrisponde alla corteccia motoria. All'interno dell'encefalo e della corda spinale, le superfici dorsali e ventrali giocano un ruolo principale nell'organizzazione dei percorsi nervosi in tutto il corpo.

3) La dimensione radiale sviluppa la complessa struttura a strati e i tipi di cellule che si troveranno poi nel cervello adulto. Attraverso la dimensione radiale del tubo neurale le piegature (rigonfiamenti) si ingrossano e si differenziano ulteriormente.

All'interno di questi rigonfiamenti le cellule **PROLIFERANO** (nascono), **MIGRANO** (viaggiano) e si **DIFFERENZIANO** in tipologie differenti. La maggior parte delle cellule che formeranno il cervello nascono nelle cosiddette **ZONE PROLIFERATIVE**. Queste zone sono vicine alla cavità del tubo neurale (ed in seguito diventeranno i ventricoli del cervello).

La prima di queste zone si chiama **ZONA VENTRICOLARE** e la seconda **ZONA SUBVENTRICOLARE**. Queste due zone producono separatamente, glia (cellule di supporto ai neuroni) e linee di cellule neuronali che condurrà a differenti forme di migrazione.

I neuroni e le cellule gliali sono prodotte dalla divisione delle cellule proliferate all'interno delle zone proliferative per produrre un **CLONE** (gruppo di cellule prodotte dalla divisione di una singola cellula precursore che produce un lignaggio).

I **NEUROBLASTI** producono i neuroni (in numero limitato e talvolta specialistico)

I **GLIOBLASTI** producono le cellule glia

Si possono individuare otto fasi dello sviluppo fetale ed embrionale a livello cellulare:

- 1) Mitosi/Proliferaazione
- 2) Migrazione
- 3) Differenziazione
- 4) Aggregazione
- 5) Sinaptogenesi
- 6) Mortoneurale
- 7) Riorganizzazione sinaptica
- 8) Mielinizzazione

Le 8 fasi sono sequenziali per un dato neurone ma avvengono simultaneamente lungo tutto l'arco dello sviluppo fetale

### **2.2.1. Mitosi/Proliferaazione: neuroni e cellule gliali**

Una volta generati i neuroni essi devono **MIGRARE** dalle zone proliferative alle regioni specifiche e impiegate nella formazione di un cervello maturo (figura 10, 2.2.1).

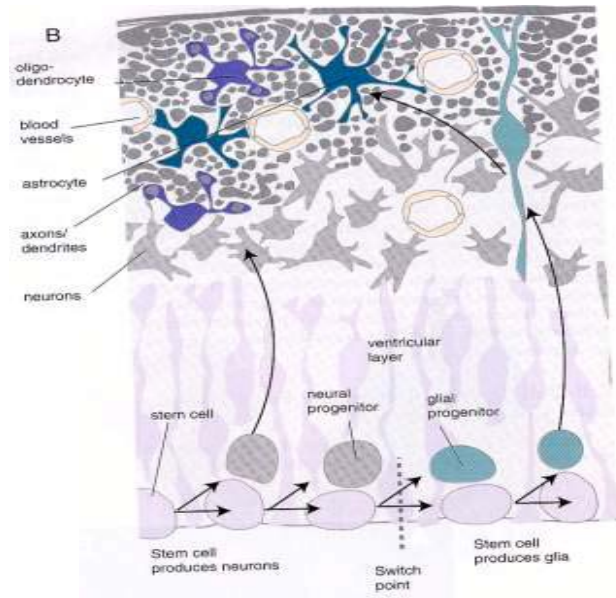


Figura 10 (migrazione)

Ci sono due forme di migrazione:

**MIGRAZIONE PASSIVA:** le cellule nuove spingono quelle vecchie fuori dalla zona proliferativa formando quindi la struttura esterna del cervello: talamo, il giro dentato dell'ipocampo ed altre regioni dell'encefalo.

**MIGRAZIONE ATTIVA:** le cellule giovani oltrepassano quelle vecchie per dar vita alle strutture interne: questo pattern si trova nella corteccia cerebrale ed in alcune aree sottocorticali a struttura laminare.

### 2.2.2. Migrazione

La differenziazione continua ad avvenire anche durante la migrazione (figura 11, 2.2.2)

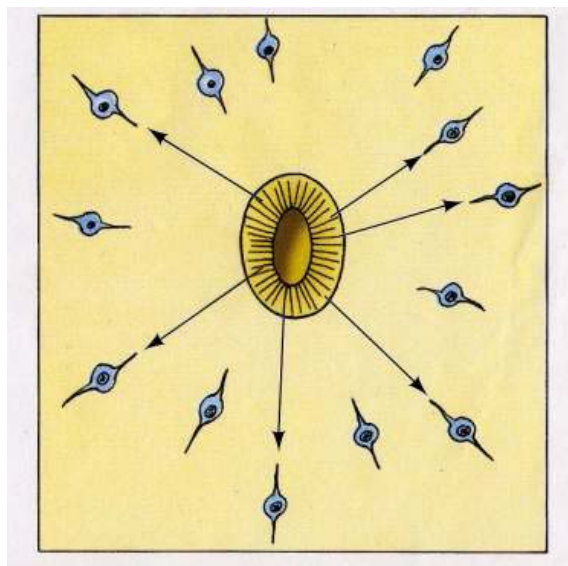


Figura 11 (differenziazione durante la migrazione)

Migrazione delle cellule gliali: le cellule gliali agiscono da connessioni guida per la migrazione dei neuroni (figura 12,2.2.2)

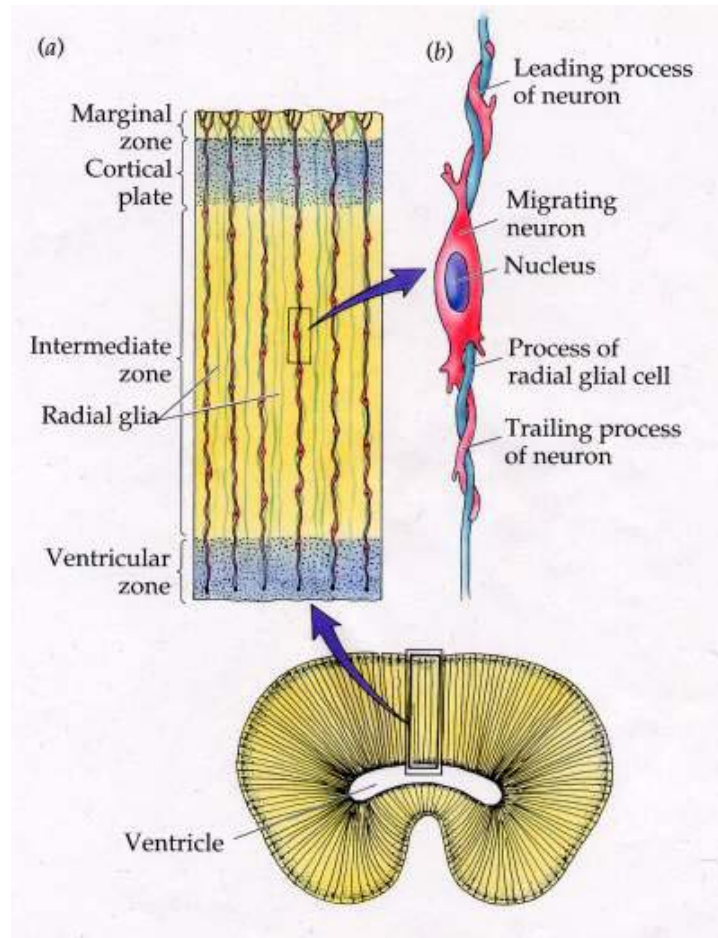


Figura 12 (migrazione delle cellule gliali)

I neuroni procedono lentamente e contemporaneamente formano gli assoni. La loro estensione viene controllata e direzionata dall'ambiente esterno (figura 13, 2.2.2).

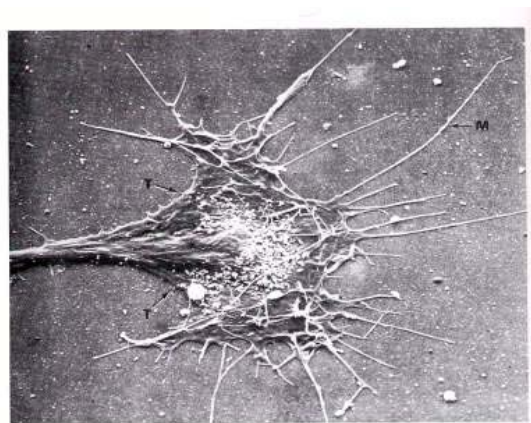


Figura 13 (formazione degli assoni)



I meccanismi con cui il neurone, durante il processo di migrazione, sceglie la strada per sapere dove migrare sono i seguenti:

- Segnali estrinseci
- Segnali estrinseci provenienti da sorgenti diverse
- Percorsi di trasduzione di segnali generici
- Determinanti intrinseche

### 2.2.3. Differenziazione

I neuroni iniziano a specializzarsi, si sviluppano (assoni e dendriti) e sviluppano una conduzione elettrica (figura 14 – 15, 2.2.3)

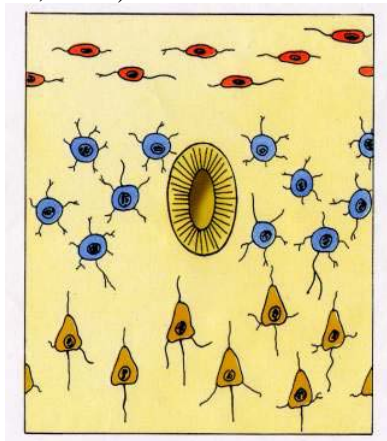


Figura 14 (differenziazione)

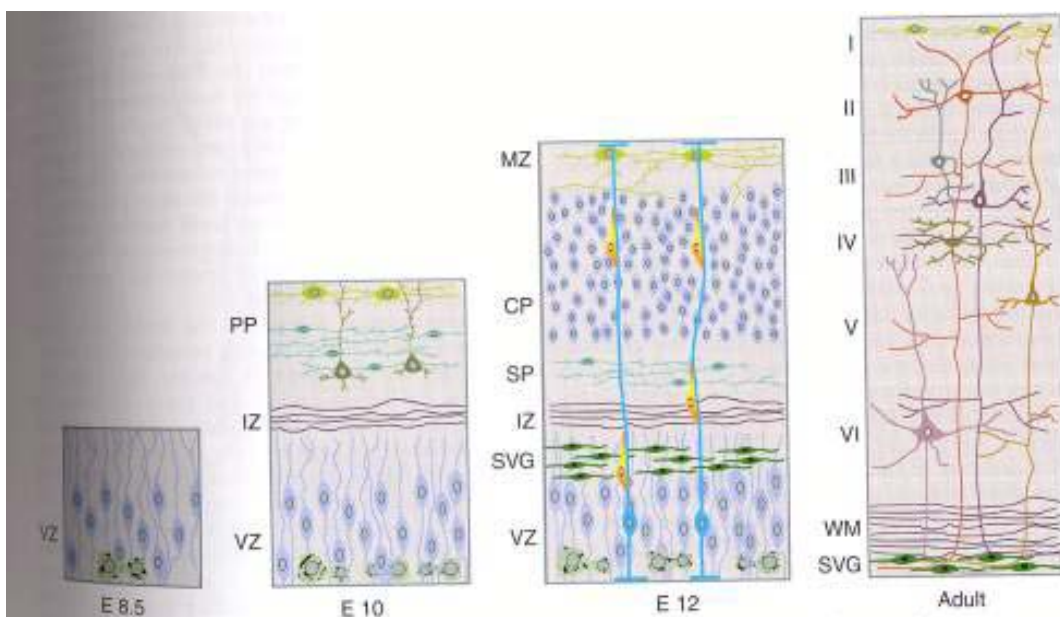


Figura 15 (specializzazione e crescita)

## 2.2.4 Sviluppo della corteccia cerebrale

La zona ventricolare (VZ) contiene i progenitori dei neuroni e delle glia. I neuroni stabilizzano la piattaforma (PP); i loro assoni e quelli provenienti dal talamo stabiliscono la zona intermedia (IZ). I neuroni che si generano più tardi stabiliscono gli strati II-IV. Dopo la migrazione e la differenziazione ci sono 6 strati corticali.

## 2.2.5 Aggregazione

I neuroni si muovono assieme e si formano gli strati. L'80% dei neuroni nella corteccia si chiamano cellule piramidali (figura 14, 2.2.3)

## 2.2.6. Sinaptogenesi

Gli assoni si connettono ad altri neuroni attraverso le sinapsi (figura 16, 2.2.6)

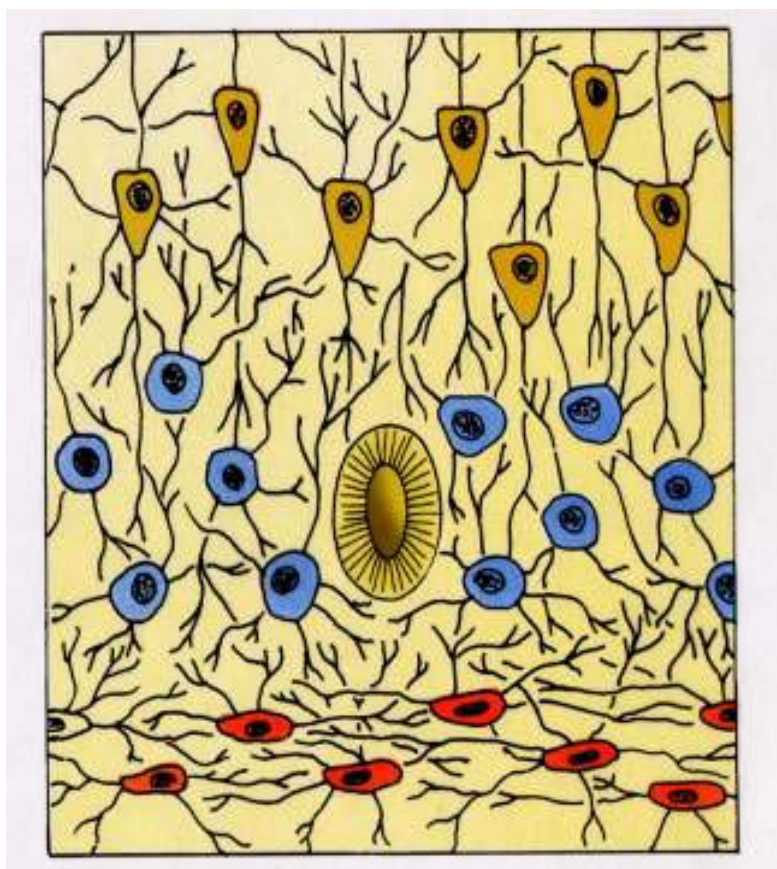


Figura 16 (connessioni sinaitiche)

### 2.2.6.1 Sinaptogenesi: attrazione verso le cellule target

Le cellule target rilasciano dei segnali chimici che creano un gradiente intorno (puntini). I dendriti si orientano e seguono questo gradiente (figura 17, 2.2.6.1).

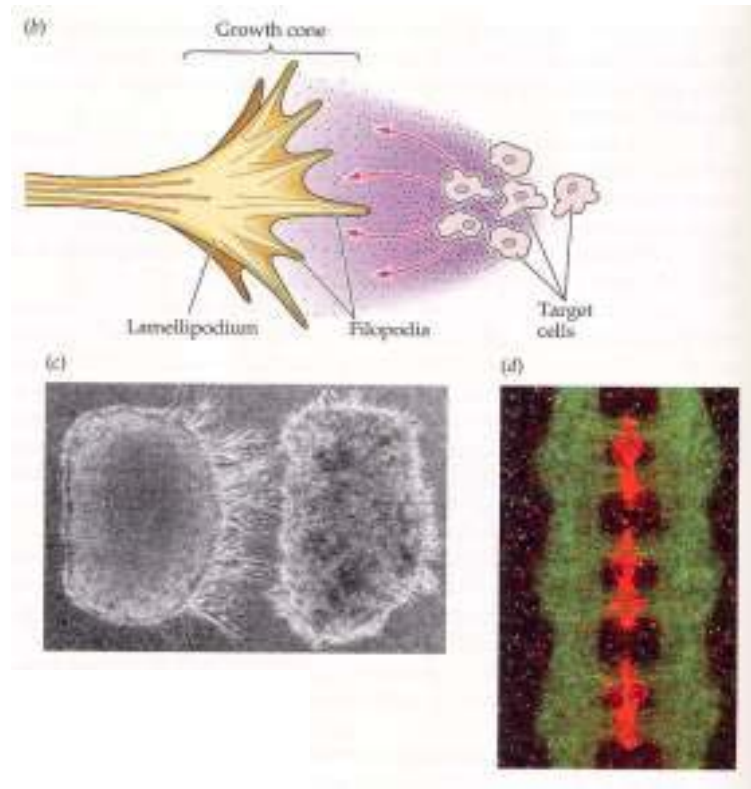


Figura 17(sinaptogenesi)

### 2.2.7 Morte neuronale

Tra il 40 e il 75 per cento dei neuroni nati non sopravvivono; fallimento della connessione sinaptica (figura 18, 2.2.7).

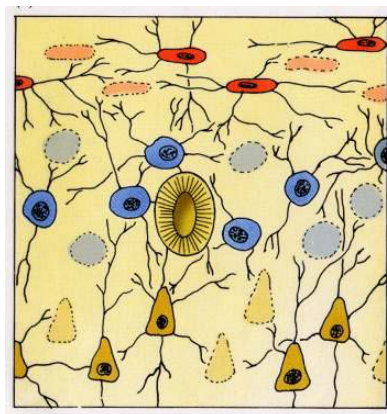


Figura 18 (morte neuronale)

## 2.2.8 Riorganizzazione sinaptica

In base al fallimento delle connessioni e alla morte neuronale, ogni neurone sopravvissuto si riorganizza per cercare di creare nuove connessioni.

## 2.2.9 Mielinizzazione (la guaina dell'assone che permette il rilascio dei neurotrasmettitori)

Il processo di Mielinizzazione dura fino a trent'anni (figura 19, 2.2.9)

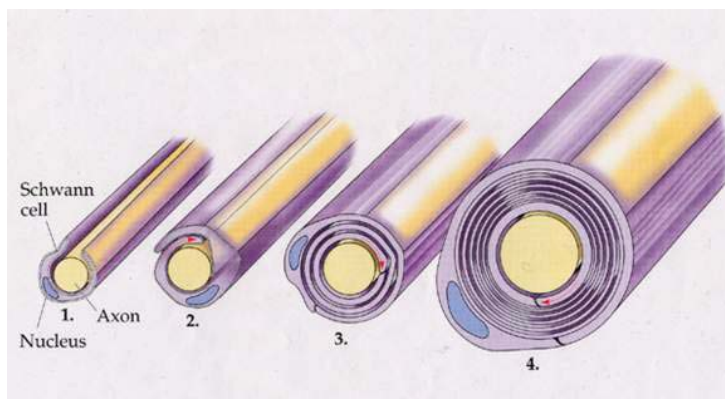


Figura 19 (mielinizzazione)

La figura seguente mostra il peso del cervello durante lo sviluppo (figura 20, 2.2.10).

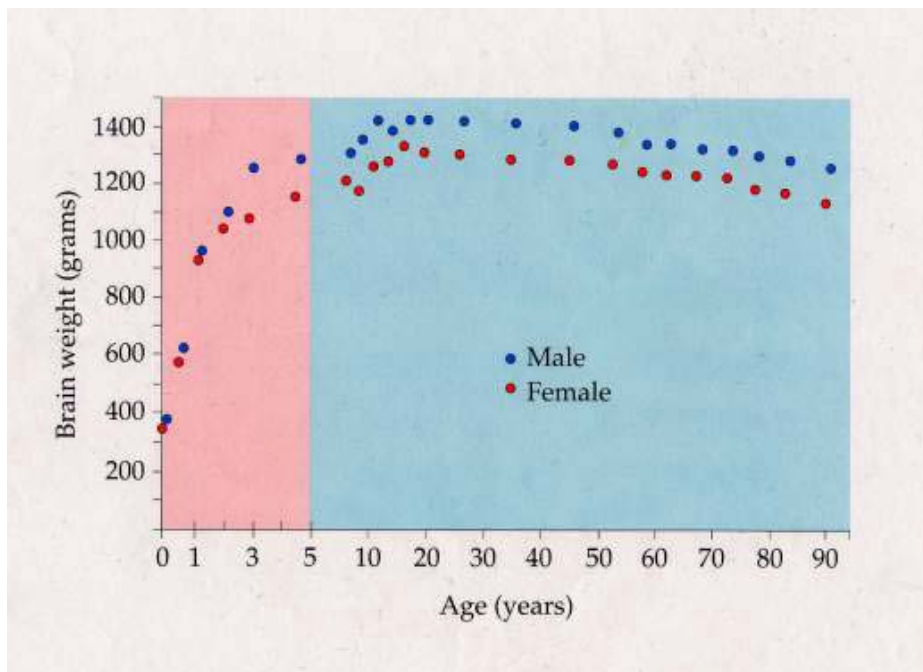


Figura 20 (peso del cervello; differenze in base al sesso)



La seguente figura mostra i periodi più critici dello sviluppo (figura 21, 2.2.11)

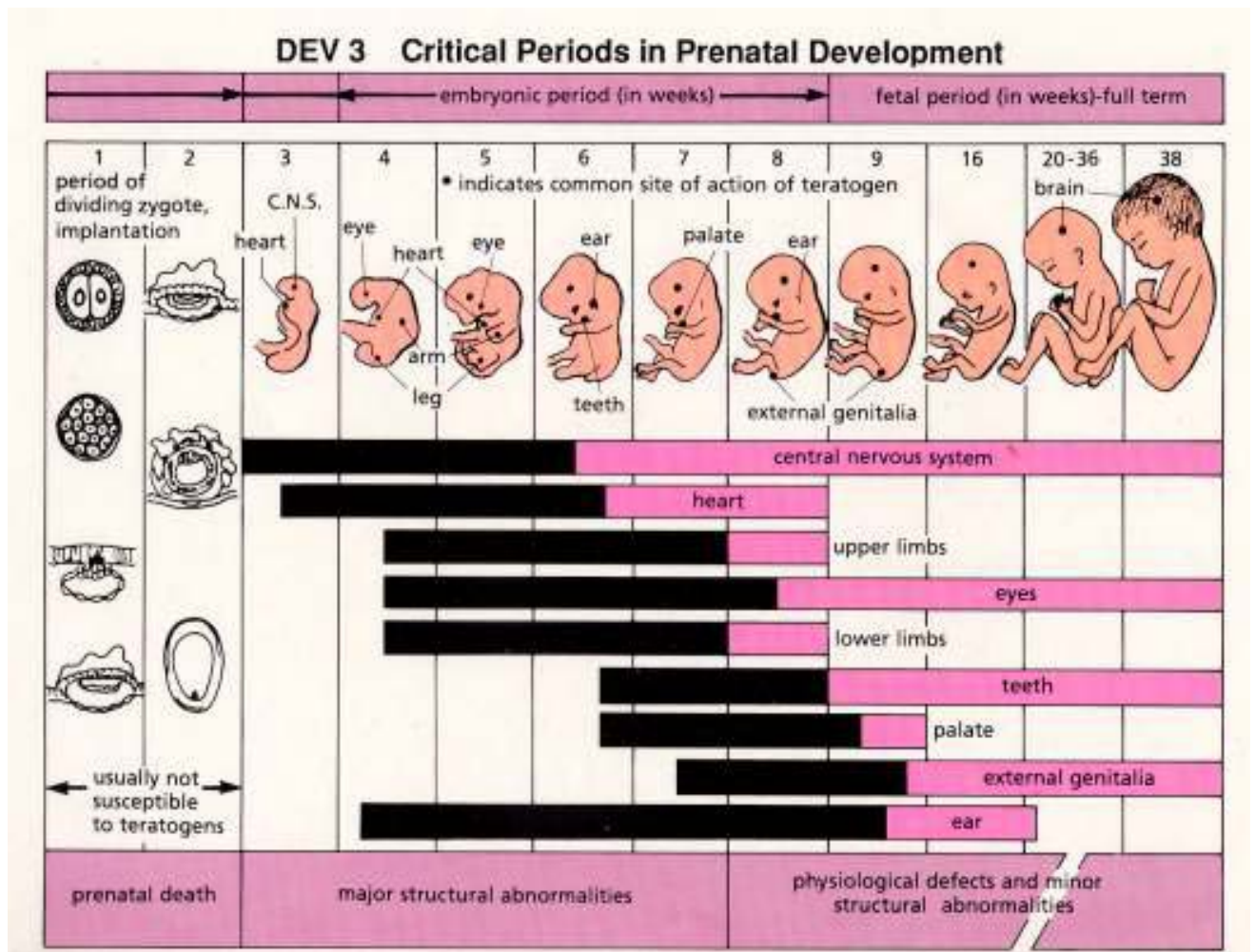


Figura 21 (periodi critici dello sviluppo)

### 2.3 Conclusioni

Lo sviluppo prenatale non è un processo passivo limitato all'esecuzione dei codici. Piuttosto è di fondamentale importanza l'interazione tra le cellule, inclusi i segnali elettrici trasmessi tra i neuroni.

La trasmissione di segnali elettrici tra neuroni nell'organismo che si sviluppa, gioca un ruolo importante nella specificazione delle strutture cerebrali prima ancora degli input sensoriali del mondo esterno.

## **Capitolo 3**

### **Tecniche di indagine dei tessuti biologici**

#### **3.1 Stato dell'arte**

La patologia umana, causata da problemi vascolari, tumorali, traumatici, ischemici, ecc., è stata per molto tempo una delle principali fonti di scoperte sulle relazioni tra cervello e comportamento. Lo studio dei soggetti con patologia, però, pone spesso il problema che un disturbo neurologico altera con frequenza la funzione del cervello nel suo complesso, rendendo molto difficile stabilire la relazione tra disturbo e relativo correlato neurale.

Il progresso tecnologico e la realizzazione di sempre nuove e sofisticate attrezzature che consentono di indagare le strutture cerebrali, può considerarsi una tra le importanti novità delle neuroscienze.

Vale la pena allora accennare brevemente alle tecniche di neuroimaging, maggiormente utilizzate per indagare l'attività cerebrale, ai principali pregi e difetti, analizzandone anche i limiti nell'utilizzo con gli infanti.

#### **3.2 La Tomografia Assiale Computerizzata (TAC)**

Consente la ricostruzione tridimensionale della struttura cerebrale, mettendo in evidenza soprattutto le zone del cervello ad alta intensità, come le ossa, rispetto quelle a bassa intensità, come l'aria, il sangue e tutto ciò che può essere compreso tra questi due estremi. Sfrutta i raggi x e un sistema di proiezione e ricezione dei raggi che ruota fino a 180 gradi. Ciò consente di ricostruire la struttura del cervello nel suo insieme, partendo da tante singole immagini registrate con angolazioni differenti. Lo strumento non è capace di rilevare le differenze tra le zone del cervello con densità simile, come la sostanza bianca dalla sostanza grigia. La risoluzione è scarsa, da 0,5 a 1 cm e ciò

consente una buona rappresentazione delle ossa, cavità orbitali e ventricoli. Costringe il soggetto all'immobilità, è usata per rilevare patologie tumorali o ischemiche ma non può essere utilizzato con gli infanti.

### **3.3 La Risonanza Magnetica Nucleare (RMN)**

Sfrutta la proprietà di rotazione dei protoni dei nuclei d'idrogeno, presenti in tutte le cellule del nostro organismo con densità variabile. Genera un campo magnetico che interrompe la rotazione dei protoni e tramite la somministrazione e rapida interruzione di onde a radiofrequenza, l'emissione di segnali da parte dei protoni in base alla relativa densità del tessuto. I segnali sono captati dai recettori posti intorno la testa. Ha un'ottima risoluzione spaziale, di circa 1 mm, consente la netta distinzione di ossa, sostanza bianca dalla grigia, corpo calloso, solchi e giri della corteccia. Costringe il soggetto immobile ed è applicabile ai neonati.

-L'angiografia sfrutta le proprietà di un tracciante radioattivo per rilevare la rete vascolare del cervello con una buona risoluzione dei principali vasi venosi e arteriosi. Non è utilizzabile con gli infanti.

### **3.4 L'Elettroencefalogramma (EEG)**

E' uno strumento che rileva l'attività elettrica globale del nostro cervello, tramite elettrodi posti sul cuoio capelluto. Stati comportamentali differenti sono associati a tracciati EEG diversi, costanti e prevedibili, così l'EEG diviene uno strumento utilissimo per rilevare anomalie della funzione cerebrale. Può essere utilizzato negli infanti ma solo a scopo diagnostico.

### 3.5 I Potenziali Evento Correlati (ERP -event related potential-)

Utilizzano il sistema EEG ma sincronizzato con uno specifico evento correlato che può essere, ad esempio, un compito comportamentale richiesto ad un soggetto sperimentale. La media dei valori di tutte le prove, con e senza evento correlato, consente di sottrarre tutta l'attività cerebrale non sincronizzata all'evento, per rilevare solo la piccola attività dipendente dall'evento. E' uno strumento con una elevatissima risoluzione temporale, mettendo in evidenza l'attività cerebrale in tempo reale ma ha una bassa risoluzione spaziale rilevabile tramite la cosiddetta "modellizzazione inversa".

E' molto utilizzata nella ricerca con gli infanti (Fig. 1a, 1b, 3.4).

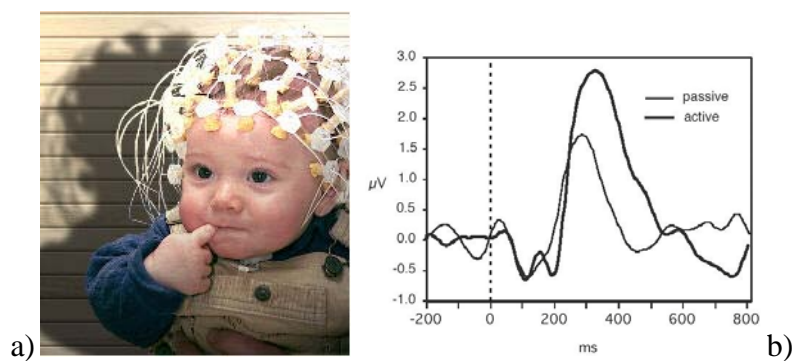


Figura 1a (soggetto con cuffia utilizzata nelle misurazioni con ERP). Figura 1b (esempio di grafico risultante da misurazione con ERP)

### 3.6 La Magnetoencefalografia (MEG)

Utilizza la stessa tecnica dell'ERP per rilevare l'attività magnetica dei neuroni. Il sistema è simile al precedente ma non si parla più di potenziali evento correlati ma di campi evento correlati.

Ha un'ottima risoluzione temporale e spaziale (modellizzazione inversa) grazie alla capacità dei campi magnetici di attraversare tutta la superficie cerebrale senza la minima distorsione, caratteristica dei segnali elettrici. Tale strumento ha un costo ancora piuttosto proibitivo e consente



un'ottima risoluzione dei segnali provenienti dai dendriti apicali, per lo più localizzati nei solchi, il cui l'asse maggiore di ogni neurone è parallelo alla superficie cranica.

### **3.7 La Tomografia ad Emissione di Positroni (PET)**

Utilizza un tracciante radioattivo, solitamente una molecola instabile dell'acqua ( $^{15}\text{O}$ ). A causa dell'instabilità questi isotopi decadono rapidamente emettendo un positrone che collidendo con un elettrone da origine a due fotoni che s'irradiano in direzione opposta alla velocità della luce e vengono rilevati dai sensori. Poiché i traccianti sono presenti nel sangue, ciò che rileva la PET è la zona di collisione e l'immagine ricostruita mostra la distribuzione del flusso sanguigno: la radiazione sarà più intensa dove l'afflusso di sangue è maggiore. Ha una scarsa risoluzione temporale e spaziale, limitata a circa 5-10 mm<sup>3</sup>. Non può essere utilizzata con gli infanti.

### **3.8 La Risonanza Magnetica Funzionale (fMRI)**

E' sostanzialmente simile alla RMI ma rileva le proprietà magnetiche dell'emoglobina, proteina responsabile del trasporto di ossigeno nel sangue. Ciò che viene rilevato è il rapporto tra ossigenazione ( $\text{HbO}_2$ ) e deossigenazione (Hb) -effetto BOLD da cui si ottiene il livello di saturazione di ossigeno ( $\text{satO}_2$ ) nel tessuto. Quando si è impegnati in un compito specifico, l'area cerebrale che interviene in quel compito, richiede più ossigeno. La risultante in quell'area sarà un leggero decremento di ossigeno, di circa l'1% immediatamente seguente all'esecuzione del compito, immediatamente compensata da un incremento di circa 5%. Ha un'ottima risoluzione spaziale, circa 3 mm<sup>3</sup> e non necessita di traccianti radioattivi ma ha una scarsa sincronizzazione temporale tra rilevazione dell'emodinamica cerebrale e l'evento correlato.

### 3.9 Il NIRS (Near Infrared Spectroscopy)

#### 3.9.1. Parametri ottici e fisiologici

Grazie allo sviluppo e al perfezionamento degli strumenti a nostra disposizione nel corso degli ultimi decenni è stato possibile ottenere attraverso tecniche non invasive una mappa funzionale dell'attività del cervello umano. Negli ultimi anni però, è stata ideata una nuova metodologia che si basa sulla conoscenza proveniente dal campo medico relativa alla relazione tra le proprietà ottiche dei tessuti e il loro stato funzionale: recentemente è stato infatti riscontrato che la luce a certe lunghezze d'onda attraversa la pelle, lo scalpo, il cranio ed è in grado di penetrare all'interno del cervello (Fig 1,3.9.1).

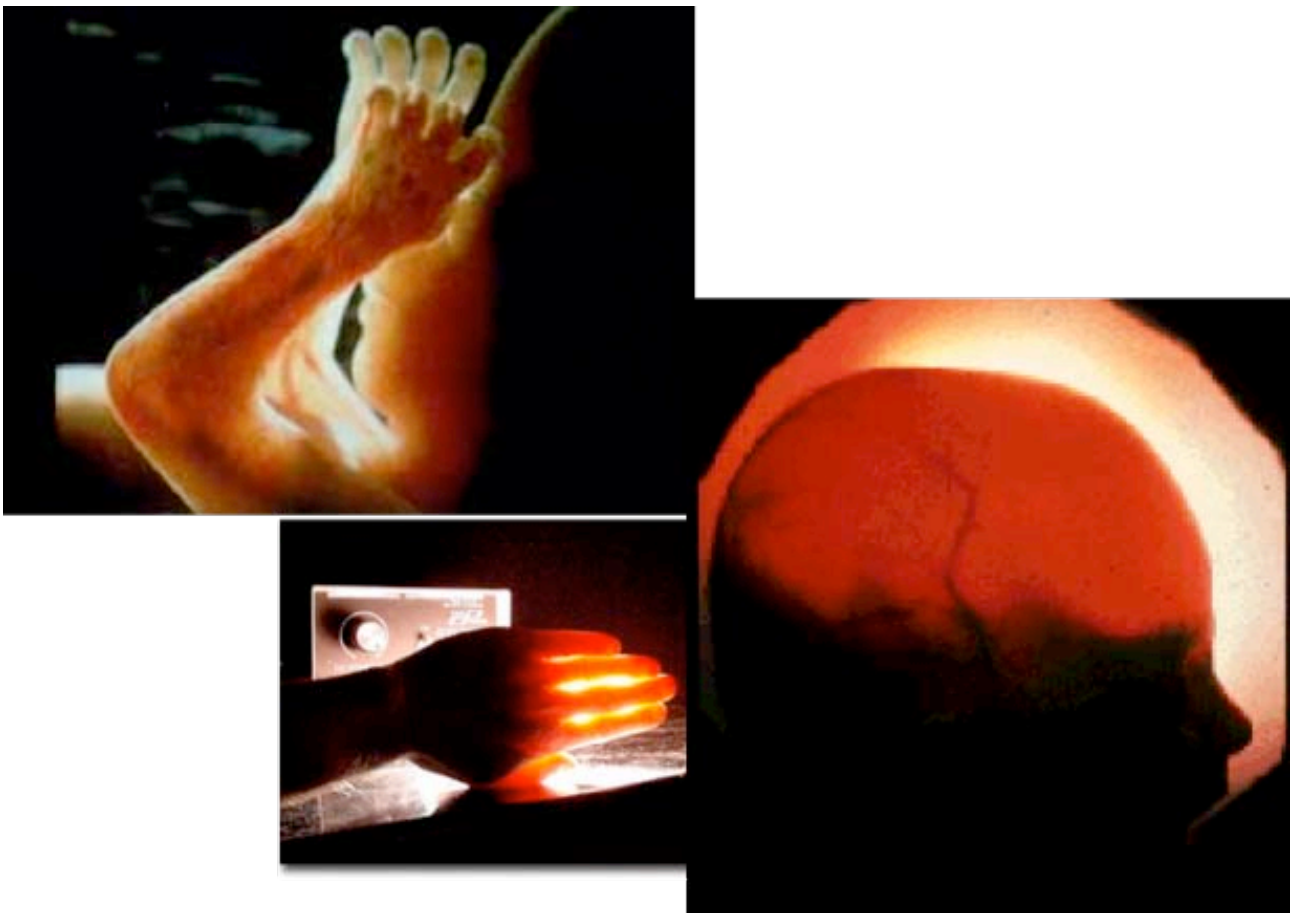


Fig 1 (tessuto umano attraversato da luce)

A grandi linee, uno strumento ottico proietta un fascio di luce attraverso il tessuto biologico che viene rilevato da un detettore e che ne registra la quantità di luce riflessa. Recentemente è stata sviluppata una tecnica di tipo funzionale basata sull'utilizzo dei raggi infrarossi chiamata *Spettroscopia nel Vicino Infrarosso (NIRS)*. Allo scopo di comprendere come vengono generate le mappe dell'attività cerebrale attraverso gli strumenti di tipo ottico, prenderemo in considerazione tre punti fondamentali: (1) *Parametri ottici*, permettono di misurare l'interazione tra i fotoni (luce) con i tessuti cerebrali; (2), *Parametri fisiologici*, gli eventi fisiologici che sono associati con l'attività cerebrale; (3), *Relazione tra i parametri ottici e fisiologici* (Villringer & Chance, 1997; Gratton, Corballis, Cho, Fabiani & Hood, 1995).

1. **PARAMETRI OTTICI:** i principali fenomeni fisici che interessano la propagazione della luce nei tessuti biologici sono l'*assorbimento* e lo *scattering*. Entrambi sono dipendenti dalla lunghezza d'onda della luce. Il cromoforo è un pigmento che assorbe la luce nella regione spettrale di interesse. La concentrazione dei cromofori varia nel tempo riflettendo i cambiamenti fisiologici del tessuto. Il principale cromoforo all'interno del tessuto cerebrale e sensibile alla luce infrarossa è l'*emoglobina*, cioè la proteina che trasporta l'ossigeno nel sangue le cui proprietà di assorbimento dipendono dal livello di ossigenazione.

- *Scattering* (diffusione): per quanto riguarda il cervello le fonti principali di scattering sono rappresentate dalle membrane cellulari poiché il contenuto solido del tessuto cerebrale è in gran parte costituito appunto da membrane. L'effetto dello scattering è quello di aumentare la lunghezza del percorso che la luce compie all'interno del tessuto.
- *Assorbimento*: costituisce il fenomeno fisico che determina una riduzione della luce in uscita in quanto trattenuta (assorbita), dai cromofori (emoglobina principalmente); i principali costituenti dei tessuti biologici che contribuiscono all'assorbimento dei raggi infrarossi sono l'acqua, i lipidi e l'emoglobina. Mentre i primi due rimangono relativamente costanti, le concentrazioni di emoglobina ossigenata e de-ossigenata variano in funzione del metabolismo e della funzione del tessuto. Acqua: l'acqua

presenta una significativa trasmissione della luce dagli ultravioletti (200 nm circa), fino all'infrarosso (circa 950 nm), la quantità di luce assorbita aumenta sensibilmente tra i 950 e i 100 nm dopo i quali è presente una ulteriore diminuzione dell'assorbimento. Anche se il coefficiente di assorbimento è basso (l'acqua assorbe poca luce) il contributo dell'assorbimento totale è significativo in quanto la concentrazione di acqua nei tessuti è molto elevata (nei neonati l'acqua corrisponde al 90%, mentre nell'adulto all'80%).

Lipidi: il coefficiente di assorbimento dei lipidi è dello stesso ordine di grandezza di quello dell'acqua, tuttavia poiché la presenza di lipidi nel cervello è ridotta, questi influenzano poco il coefficiente di assorbimento generale. Emoglobina: è il più importante costituente dei globuli rossi ed è il principale trasporto di ossigeno; nello stato ossigenato l'emoglobina è chiamata ossiemoglobina ( $HbO_2$ ), mentre nello stato ridotto è chiamata deossiemoglobina (Hb). L'ossiemoglobina e la deossiemoglobina presentano diverse caratteristiche di assorbimento della luce: mentre la prima assorbe maggiormente nelle regioni del blu e del verde dello spettro visibile, attorno ai 890 nm, l'assorbimento di Hb è maggiore intorno ai 690 (figura 2, 3.9.1).

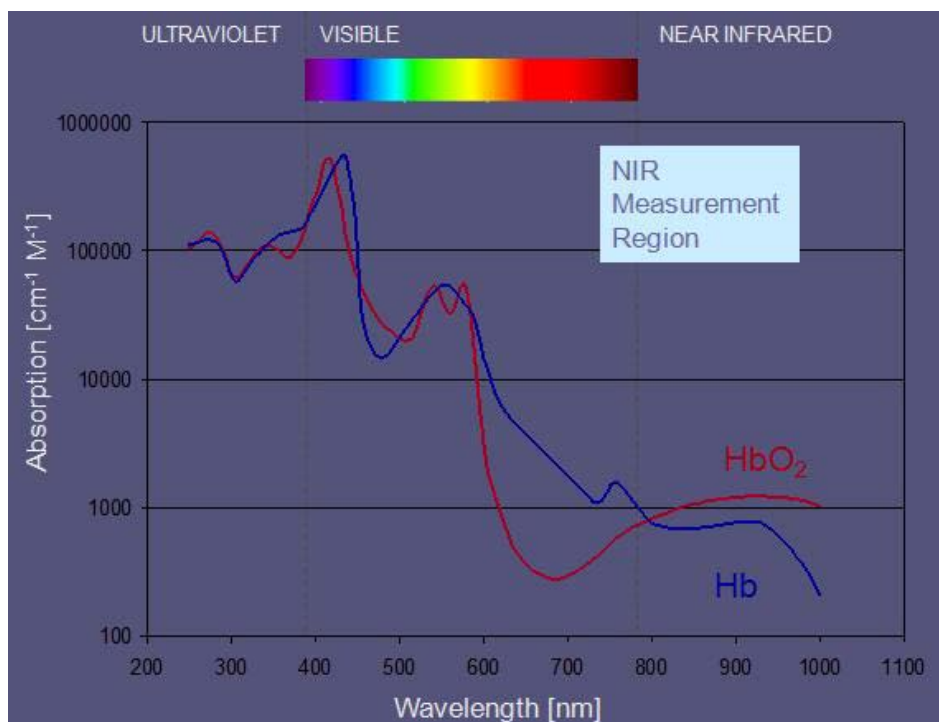


Figura 2 (spettro di assorbimento dell'emoglobina ossigenata e di quella ridotta -Meek, 2002)

La luce che attraversa il tessuto biologico viene quindi attenuata principalmente da due fenomeni fisici, l'assorbimento e lo scattering. Combinando il coefficiente di scattering e quello di assorbimento si può definire il coefficiente di attenuazione totale:

$$\mu_t = \mu_s + \mu_a$$

dove  $\mu_t$  è il coefficiente di attenuazione totale,  $\mu_s$  è il coefficiente di attenuazione dello scattering e  $\mu_a$  è il coefficiente di attenuazione dell'assorbimento.

Allo scopo di quantificare il livello di emoglobina ossigenata e non ossigenata nel sangue viene applicata la legge modificata di Lambert-Beer alla quantità di luce rilevata dai detettori (e quindi riflessa dal tessuto); tale legge è espressa dalla seguente relazione:

$$OD = -\log I/I_0 = \varepsilon * C * L * B + G$$

dove OD rappresenta la densità ottica,  $I_0$  e  $I$  sono rispettivamente l'intensità della luce incidente e di quella rilevata,  $C$  è la concentrazione del cromoforo in esame,  $\varepsilon$  è il coefficiente di estinzione specifico,  $L$  è la distanza tra il punto in cui la luce penetra nel tessuto e quello in cui la luce lascia il tessuto per poi essere rilevata,  $G$  è un fattore che tiene conto di quelle che sono le caratteristiche geometriche del tessuto in esame, infine  $B$  è detto "fattore di lunghezza del cammino" o brevemente DPF e racchiude in sé gli effetti dello scattering sul percorso del fotone all'interno del tessuto, infatti a causa di questo fenomeno il fotone percorre all'interno del tessuto un percorso più lungo e di questo si tiene conto inserendo appunto  $B$ .

2. PARAMETRI FISIologici: gli eventi fisiologici associati all'attività cerebrale possono essere suddivisi tra quelli che avvengono all'interno delle membrane cellulari e quelli di tipo neurovascolare che avvengono nello spazio vascolare. I primi si riferiscono ai cambiamenti che avvengono a livello cellulare quando queste vengono attivate, in modo particolare ci si riferisce all'incremento della consumazione di glucosio e di ossigeno; i secondi riguardano tutti gli

eventi indotti dall'attività cerebrale quali la vasodilatazione delle arterie locali ed il conseguente incremento del volume sanguigno locale cerebrale (CBV), e del flusso sanguigno (CBF).

3. RELAZIONE TRA PARAMETRI OTTICI E FISIologici: gli eventi fisiologici che avvengono nel corso dell'attività cerebrale interferiscono e influenzano le misurazioni che vengono effettuate attraverso gli strumenti ottici, andando a modificare i due parametri precedentemente esposti di assorbimento e scattering. In particolare possiamo trovare una relazione tra la diffusione della luce nei tessuti cerebrali (light scattering) e l'attività cellulare. Esiste una relazione tra il flusso sanguigno cerebrale, il livello di ossigenazione, l'attività cerebrale e il parametro ottico dell'assorbimento della luce a infrarossi: durante l'attività cerebrale, infatti, assistiamo ad un incremento del flusso sanguigno cerebrale locale (CBF) e tale incremento eccede all'incremento della consumazione di ossigeno, determinando un aumento dell'emoglobina ossigenata. Il fatto che l'emoglobina ossigenata e de-ossigenata possiedano pattern differenti di assorbimento ci permette di valutare i cambiamenti di concentrazione dell'emoglobina nel corso dell'attivazione cerebrale (Chance, Zhuang, UnAh, Alter, Lipton, 1993; Villringer, Planck, Hock, Schleinkofer & Dirnagl, 1993; Malonek & Grinvald, 1996). Figura 3,3.9.1

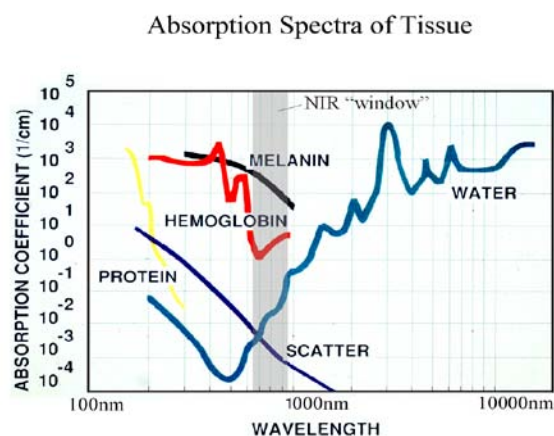


Figura 3 (spettro di assorbimento della luce)

### 3.9.2. Principi generali e funzionalità del NIRs

Negli ultimi 20 anni la ricerca è riuscita a sviluppare uno strumento in grado di fornire delle immagini ottiche dell'attività cerebrale umana attraverso una tecnica del tutto non invasiva che sfrutta la finestra di trasparenza dei tessuti biologici a specifiche lunghezze d'onda (tra i 700 e i 1000 nm circa): tale strumento è il NIRS (Near-Infrared Spectroscopy). I primi studi condotti con tale strumento sono stati eseguiti su animali, ed è stato evidenziato come il NIRS sia sensibile agli effetti diretti dell'attività neurale, come le variazioni del flusso sanguigno o del suo livello di ossigenazione. Negli anni successivi il NIRS è stato utilizzato anche sull'essere umano allo scopo di analizzare in maniera non invasiva il funzionamento dell'attività cerebrale: la luce a raggi infrarossi ha la proprietà di penetrare attraverso il cuoio capelluto e lo scalpo e può essere quindi impiegata per un'indagine sulla corteccia. Nella figura 4 viene illustrato in maniera schematica l'utilizzo del NIRS nello studio dell'attività cerebrale umana: la luce viene portata sulla testa tramite una fibra ottica, questa attraversa il cuoio capelluto e lo scalpo e viene poi misurata da un detettore il quale raccoglie la luce riflessa e la incanala in una fibra ottica di raccolta. La distanza tipica tra la sonda che trasporta la luce dalla sorgente alla testa e quella che la raccoglie è di 3-4 centimetri e normalmente è richiesto l'utilizzo di più coppie emettitori-rilevatori (Figura 4,5,3.9.2).

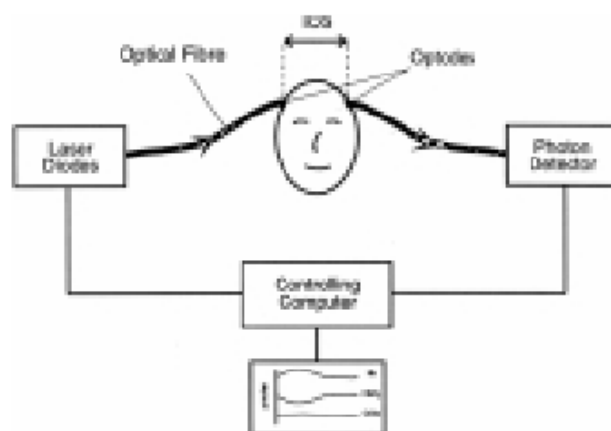


Figura 4 (rappresentazione schematica della tecnica NIRS -Meek, 2002)

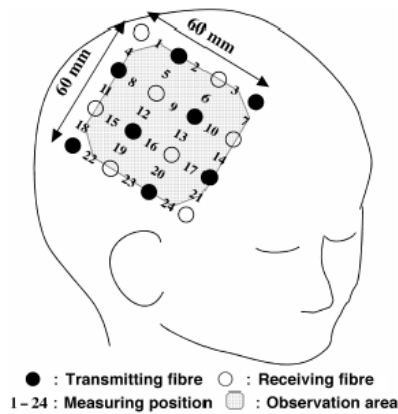


Figura 5 (collocazione schematica delle fibre posizionate sulla testa di un soggetto -Meek, 2002).

I diversi livelli di assorbimento della luce vengono quindi rilevati e trasformati attraverso una formula matematica (legge modificata di Beer-Lamber) in cambiamenti di ossigenazione e de-ossigenazione sanguigna. Il fatto che l'emoglobina ossigenata e quella de-ossigenata possiedano diverse caratteristiche di assorbimento della luce a infrarossi, fa sì che il NIRs, lavorando su due lunghezze d'onda differenti (attorno ai 680-690 nm e agli 830 nm), sia in grado di rilevare i cambiamenti dell'attività sia dell'una che dell'altra. Alla base di questa tecnica c'è l'idea che l'attivazione neurale in risposta ad una stimolazione determini un incremento della richiesta di energia all'interno dell'area coinvolta: per conciliare tale richiesta si assiste ad un incremento del flusso sanguigno cerebrale (CBF) allo scopo di trasportare ossigeno e glucosio all'interno delle regioni coinvolte nell'attività cerebrale (Meek, 2002). I cambiamenti del flusso sanguigno determinano un incremento del volume totale (HbT), il quale può essere valutato misurando la concentrazione locale di emoglobina ossigenata (HbO<sub>2</sub>) e de-ossigenata (Hb). Attraverso questa tecnica non è possibile rilevare la quantità assoluta di emoglobina, ma soltanto i cambiamenti di ossigenazione e de-ossigenazione della stessa a partire da una baseline arbitraria. Questa tecnica, utilizzata soprattutto in situazioni dove i cambiamenti fisiologici di ossigenazione e de-ossigenazione avvengono spontaneamente, permette di creare le basi per poi rilevare, all'interno di singole regioni, i cambiamenti dei livelli di ossigenazione sanguigna durante una specifica attivazione corticale. In termini più pratici, misurando l'intensità della luce riflessa durante una



stimolazione e confrontandola con quella baseline (misurata in assenza di stimolazione) è possibile acquisire tutta una serie di informazioni dell'attività emodinamica relativa all'attivazione cerebrale.

Oltre alla misurazione dei cambiamenti dell'emoglobina ossigenata e deossigenata il NIRS può essere utilizzato per ottenere altri 3 tipi di informazioni estremamente interessanti (Wolfberg & du Plessis, 2006):

- Cerebral blood volume (CBV): viene calcolato combinando i cambiamenti dell'emoglobina ossigenata con quelli della sua concentrazione (Wyatt, Delpy, Cope, Wray & Reynolds, 1986; Wyatt, Delpy, Cope, Richardson, Edwards, Wray & Reynolds, 1990).
- Cerebral blood flow (CBF): viene calcolata confrontando i cambiamenti sistemici della saturazione emoglobina ossigenata (pulse oximetry) con i pattern di cambiamento della concentrazione della stessa durante un brevissimo periodo di tempo (Edwards, Richardson, Cope, 1988; Bucher, Edwards, Lipp & Duc, 1993).
- Cerebral venous saturation: viene calcolato misurando i cambiamenti della concentrazione dell'emoglobina durante le procedure che causano un breve cambiamento del volume venoso cerebrale (es. breve occlusione della giugulare). (Yoxall, Weindling, Dawani, Peart, 1995; Kissack, Garr, Wardle & Weindling, 2005).

Studi su diversi tipi di tessuti suggeriscono che l'incremento dell'attività cerebrale sia associata ad un iniziale decremento dell'emoglobina ossigenata seguita subito da un più lento incremento della stessa (Malonek & Grinvald, 1996). Gli studi condotti attraverso il NIRS si sono concentrati maggiormente nell'analizzare la fase di incremento dell'emoglobina ossigenata, che avviene pochi secondi dopo la presentazione di uno stimolo. Dati provenienti da studi condotti con la risonanza magnetica funzionale e le misurazioni del livello di ossigenazione sanguigna suggeriscono che il flusso cerebrale in risposta ad un'attività funzionale risulti maggiore rispetto

all'incremento stesso della consumazione di ossigeno. Per questo motivo quando viene misurato attraverso il NIRs il flusso sanguigno durante una specifica attività (come ad esempio la corteccia occipitale durante la stimolazione visiva) viene evidenziato un incremento dell'emoglobina ossigenata, accompagnato da un decremento di quella de-ossigenata (Bartocci, Winberg, Papandieck, Mustica, Serra & Lagercrantz, 2001; Bartocci, Winberg, Ruggero, Bergqvist, Serra & Lagercrantz, 2000). Risultati diversi sono stati ottenuti in alcune ricerche, le quali hanno mostrato un incremento anche dell'emoglobina de-ossigenata assieme a quella ossigenata (Sakatani, Chen, Lichty, Zuo & Wang, 1999; Hoshi & Tamura, 1993; Kato, Kamei, Takashima. & Ozaki, 1993), tuttavia tali risultati riferendosi a soggetti appena nati, si ritiene siano dovuti alla relativa immaturità del sistema vascolare dei bambini stessi.

Con il NIRs è possibile rilevare l'attivazione di più regioni cerebrali attraverso l'utilizzo di diversi detettori che rilevano la quantità di luce assorbita nelle diverse aree di interesse. Attraverso questa metodologia è possibile realizzare una mappa topografica dell'attivazione cerebrale, che permette di isolare le regioni di massima attivazione, rendendo possibile effettuare una misurazione più accurata dei cambiamenti emodinamici all'interno della singola regione di interesse (Fig. 6,3.9.2).

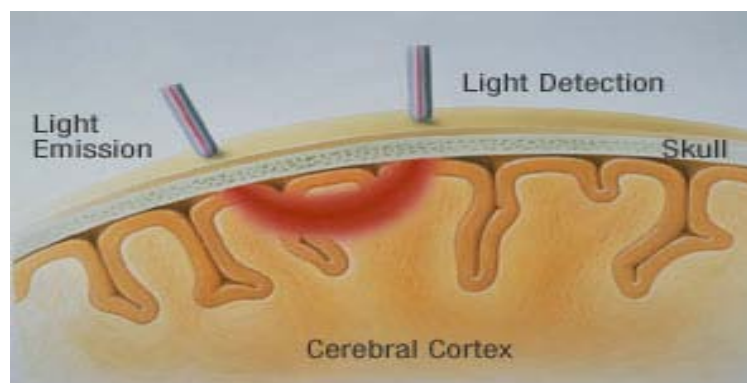


Figura 6 (esempio di proiezione e detezione della luce NIR attraverso il cranio)

La concentrazione dei cromofori (le molecole che sono responsabili del colore del sangue a causa del loro diverso assorbimento della luce a seconda delle diverse lunghezze d'onda) cambia a seconda della richiesta metabolica dei neuroni in una data regione corticale, consentendo così la misurazione dell'attivazione funzionale del cervello.

### 3.9.3. Tre tipologie di spettroscopia NIR

Attualmente possiamo distinguere tre tipologie di spettroscopia NIR: (1) *Continuous-wave instrument (CW)* attraverso la quale viene misurata l'intensità della luce trasmessa all'interno di una regione fissa; questa tipologia di misurazione ci permette di osservare i cambiamenti del flusso sanguigno cerebrale in tempo reale attraverso l'osservazione dei cambiamenti della concentrazione di emoglobina; (2) *Time-resolved near-infrared spectroscopy* ha l'obiettivo di misurare il tempo che impiega un impulso laser a passare attraverso un tessuto. Questa tecnica permette di misurare la concentrazione assoluta di emoglobina; (3) *Frequency domain instrument (FD)* che utilizza delle sorgenti di luce a frequenza radio modulata e dei detettori in grado di quantificare l'assorbimento e lo scattering della luce nei tessuti (Wolfberg & du Plessis, 2006; Zang et al., 2000; Hoshi, 2003).

**1. Continuous-wave instrument (CW):** il CW instrument misura l'intensità di luce trasmessa dai tessuti e calcola i relativi cambiamenti della concentrazione di emoglobina secondo la legge modificata di Beer-Lambert (Hoshi, 2003). Tale strumento è costituito da due sorgenti di eccitazione (luce) e un sistema di rilevazione del segnale costituito da un doppio canale di detettori. La sorgente di eccitazione consiste in due laser che lavorano su due lunghezze d'onda differenti, uno a 830 nm e uno a 690 nm, maggiormente sensibili rispettivamente all'emoglobina ossigenata (HbO<sub>2</sub>) e a quella de-ossigenata (Hb) (Zang et al., 2000). La luce è trasmessa attraverso delle fibre ottiche nel cervello, dove questa si disperde (scattering) e viene assorbita (Wolfberg & du Plessis, 2006). La luce che viene riflessa viene catturata dai detettori e

la quantità di luce assorbita ad ogni specifica lunghezza d'onda viene convertita attraverso la legge modificata di Beer-Lambert in cambiamenti quantitativi di emoglobina ossigenata e deossigenata. Attraverso questo strumento è possibile misurare i cambiamenti della concentrazione dei cromofori, ma non è possibile stabilirne la quantità assoluta.

- 2. Time-resolved instrument (TRS):** permette di misurare i coefficienti di assorbimento e scattering a partire dalla misura della risposta temporale del tessuto ad un impulso (Wolfberg & du Plessis, 2006). E' possibile infatti stimare il coefficiente di assorbimento attraverso la misurazione dei profili temporali dei tempi di risposta con i modelli teorici della diffusione dei fotoni all'interno di tessuti umani.
  
- 3. Frequency-domain instrument (FD):** questa tipologia di strumento (quella utilizzata nella ricerca) permette di determinare la Componente Continua del segnale (C.C), l'ampiezza A.C (Alternating Current) e la fase del segnale di intensità modulata in 8 o più canali. Essa permette, inoltre, di ottenere misurazioni per quanto riguarda sia la quantità di luce assorbita dal tessuto in esame, che la diffusione della stessa all'interno del tessuto (scattering). Tale strumento è costituito generalmente da 16 sorgenti di luce, collegate al cranio con fibre ottiche (8 con una lunghezza d'onda di circa 690 nm, e 8 di 830 nm) e un detettore di 3 millimetri di diametro che riceve la luce riflessa e la collega allo strumento (IMAGENT) sempre attraverso le fibre ottiche. Ogni sorgente di luce dista dalle altre 3 cm e viene attivata singolarmente o a coppie. La luce viene riflessa dal tessuto per essere raccolta alla fine dal detettore. Successivamente viene accesa la seconda sorgente di luce e così via per tutte le altre rimanenti: un ciclo di misurazioni risulta completo quando tutte le sorgenti sono state accese. L'intensità della luce proiettata viene modulata in maniera casuale per ogni ciclo di misurazioni: questa variabilità dell'intensità di luce permette di penetrare all'interno del cervello in maniera più o meno profonda, in modo tale da rilevare l'attività cerebrale di strutture situate in diverse posizioni e profondità. Tale

metodologia ha il vantaggio di poter ottenere direttamente il coefficiente di assorbimento e di scattering attraverso i quali è possibile calcolare i cambiamenti della concentrazione di emoglobina nelle aree interessate (Zang et al., 2000). Figura 7, 8a,8b, 3.9.3.

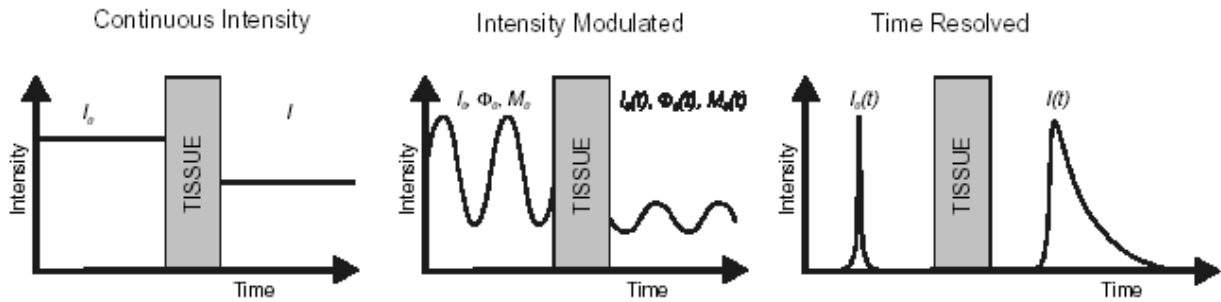


Figura 7. (tre tipologie fondamentali di spettroscopia NIR)

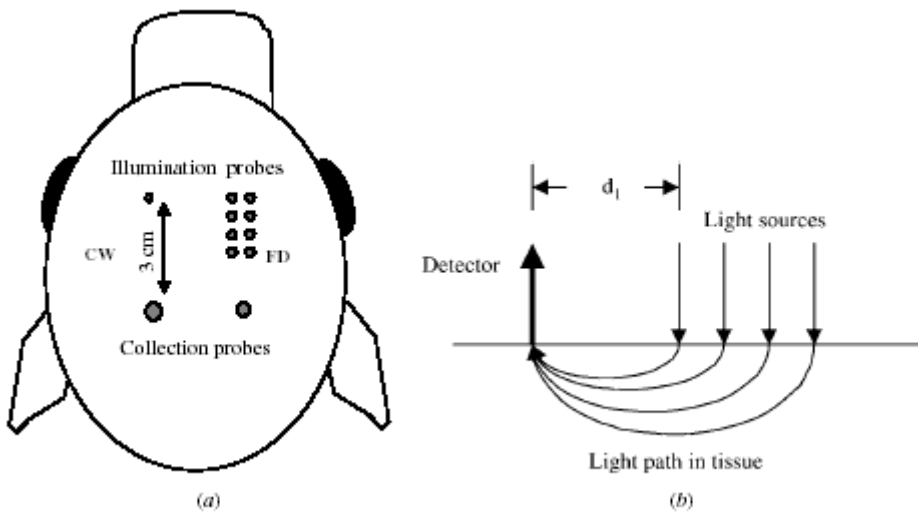


Figura 8 (rappresentazione schematica dell'applicazione sullo scalpo delle due tipologie di strumenti CW e FD. Figura 8b (frequency-domain instrument -Zang et al. 2000).

In uno studio interessante condotto da Zang et al. (2000) sono stati messi a confronto i dati ottenuti con due delle tipologie di misurazione NIRs (CW e FD), allo scopo di valutare la loro affidabilità e precisione nel misurare i valori di interesse (cambiamento dell'ossigenazione sanguigna). I risultati hanno evidenziato delle eccellenti correlazioni tra i due segnali ( HbO2-

CW/HbO<sub>2</sub>-FD; Hb-CW/Hb-FD) evidenziando la capacità della continuous-wave spectroscopy di rilevare sia i piccoli che i grandi cambiamenti dell'attività emodinamica e dell'ossigenazione cerebrale.

#### **3.9.4. Vantaggi e svantaggi del NIRs**

In conclusione, possiamo individuare diversi vantaggi e svantaggi relativi all'utilizzo del NIRs nello studio della funzionalità cerebrale umana rispetto alle altre tecniche di brain imaging (Hoshi, 2003).

Per quanto riguarda i vantaggi, il primo è costituito dalla buona risoluzione spaziale e temporale di tale strumento. La miglior risoluzione temporale offerta dal NIRS consente, ad esempio, una miglior distinzione dei diversi segnali di inquinamento provenienti dagli altri sistemi fisiologici o da movimenti imprevedibili. Rispetto alle tecniche elettrofisiologiche (EEG, ERP, MEG) dove è difficile rilevare l'origine dell'attivazione, la risoluzione spaziale del NIRS è abbastanza buona. Un altro vantaggio relativo all'utilizzo di tale strumento è legato al suo non essere invasivo e per questo è possibile utilizzarlo per più volte sullo stesso soggetto senza recare danni. Il NIRs è lo strumento prediletto per lo studio dell'attività cerebrale dei bambini, in quanto, oltre al non essere invasivo, presenta per questi soggetti un numero minore di difficoltà, in quanto nei bambini (avendo pochi capelli e lo spessore dello scalpo ancora ridotto) le barriere che la luce deve superare sono inferiori, e può quindi raggiungere le aree cerebrali che si trovano più in profondità.

Per quanto riguarda gli svantaggi relativi all'utilizzo del NIRS, il primo è legato al suo grado di affidabilità e accuratezza ancora incerta, dovuta principalmente alla conoscenza ancora scarsa della modalità di scattering e assorbimento della luce relativi ai diversi tessuti cerebrali. Un secondo problema potrebbe essere determinato dalla presenza di ostacoli, quali scalpo e cuoio capelluto, che potrebbero inficiare la bontà delle misurazioni. Il terzo problema, collegato ai due appena descritti, è collegato alla capacità della luce di penetrare i tessuti neurali: a causa della rapidità con cui la luce

a infrarossi si diffonde nei tessuti neurali, il NIRS potrebbe risultare inadatto per investigare l'attività neurale in strutture situate più in profondità, approssimativamente al di sotto dei 2-3 centimetri dalla superficie del cervello. La quarta e ultima difficoltà relativa all'utilizzo del NIRS è determinata dall'impossibilità di identificare l'esatta area cerebrale sottostante alla luce: per ottenere informazioni anatomiche, quindi, le immagini ottiche necessitano di essere combinate con le misurazioni tridimensionali della risonanza magnetica (Hoshy, 2003). Figura 9,3.9.4.

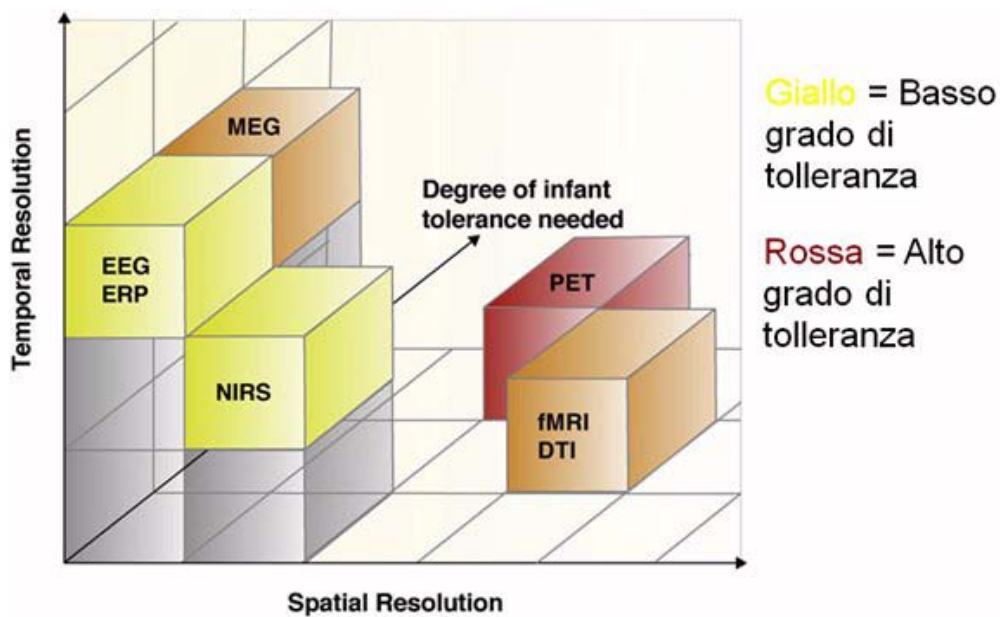


Figura 9 (l'applicazione NIRs nei diversi ambiti dello sviluppo)

Il NIRs è stato applicato con molto successo in campo medico negli studi su bambini prematuri. Meek e colleghi (Meek, Tysczuk, Elwell & Wyatt, 1998) hanno dimostrato che il CBF è estremamente basso nei bambini pretermine e incrementa dopo 3 giorni di vita in seguito all'adattamento alle condizioni extrauterine. Un basso CBF in questo periodo è associato ad un incremento nel rischio di emorragie intraventricolari con conseguenti deficit nello sviluppo neurologico (Meek et al., 1998). L'utilizzo del NIRs nei bambini pretermine permette di rilevare lo status dell'attività cerebrale e vascolare dei bambini; diversi studi ( Meek,Elwell, McCormick, Edwards, Townsend, Stewart & Wyatt, 1999; Edwards, Wyatt, Richardson, Potter, Cope, Delpy &

Reynolds, 1990) hanno permesso di individuare i fattori di rischio determinanti l'insorgenza di diverse problematiche neurovascolari, anche se i dati ricavati fin ora sono ancora scarsi e non sufficienti per elaborare terapie cerebro-protettive o per essere utilizzati a livello clinico.

Così come la risonanza magnetica funzionale, anche il NIRs viene utilizzato per studiare lo sviluppo delle funzioni cerebrali, andando a valutare l'attività emodinamica delle diverse aree cerebrali durante l'esecuzione di compiti cognitivi o l'elaborazione di determinati stimoli (attività emodinamica evocata). Questa tecnica è stata infatti utilizzata per studiare il livello di maturazione dei sistemi cerebrali all'interno del cervello infantile. Sono stati svolti studi interessanti sullo sviluppo del sistema uditivo del bambino, considerato già relativamente maturo alla nascita. Sakatani e colleghi (Sakatani, Chen, Lichty, Zuo & Wang, 1999) hanno rilevato l'attività emodinamica di 28 neonati durante una stimolazione musicale in entrambe le parti della corteccia frontale. Quasi tutti i bambini hanno evidenziato un incremento sia del livello di de-ossigenazione che di quello di ossigenazione.

Oltre al sistema uditivo, è stato valutato lo sviluppo di altri sistemi sensoriali dei neonati, come quello olfattivo, anche questo considerato ben sviluppato al momento della nascita. Bartocci et al. (2000; 2001) hanno dimostrato diversi aspetti relativi alle risposte dei neonati agli odori, in particolare hanno osservato che gli odori sgradevoli elicitano un decremento nell'ossigenazione e nel totale Hb, soprattutto sopra la corteccia olfattiva destra piuttosto che quella sinistra.

### **3.9.5. L'applicazione del NIRs su soggetti adulti**

Nel paragrafo precedente abbiamo descritto come il NIRs possa essere un valido strumento per osservare il funzionamento dell'attività cerebrale di soggetti molto piccoli, quali i neonati. Attualmente la letteratura ci offre poche informazioni riguardo la funzionalità del NIRs su soggetti adulti, avendo utilizzato tale tecnica principalmente su bambini e neonati con l'obiettivo di studiarne il processo di sviluppo cerebrale.



Rimane quindi ancora poco chiaro se tale tecnica possa essere utilizzata per misurare le basi neurali di abilità cognitive maggiormente complesse, quali ad esempio l'elaborazione dei volti umani o di altre categorie di stimoli.

Per quanto riguarda gli studi condotti con il NIRs su soggetti adulti un lavoro molto importante e considerato basilare per lo sviluppo di tale tecnica investigativa è stato condotto da Hoshi & Tamura (1997), nel quale le autrici hanno analizzato il funzionamento delle diverse regioni cerebrali in 2 condizioni sperimentali: 1. In una situazione di totale relax, con gli occhi chiusi e senza stimolazioni 2. Durante l'esecuzione di compiti matematici. Gli obiettivi delle autrici erano quelli di analizzare i pattern di attivazione cerebrale, evidenziando le eventuali differenze all'interno delle diverse regioni cerebrali (frontali, temporali e occipitali) sia in situazioni di totale relax che durante una stimolazione cognitiva. Le autrici hanno trovato che i pattern temporali dei cambiamenti emodinamici variano da regione a regione in situazione di relax, in particolare hanno evidenziato differenze tra le regioni destre e sinistre dell'emisfero e tra le regioni frontali destre rispetto a quelle frontali sinistre. Le autrici hanno inoltre confrontato tali attività con quelle rilevate durante l'esecuzione mentale di compiti matematici allo scopo di testare la capacità del NIRs di rilevare le eventuali differenze. Le autrici hanno trovato che l'esecuzione dei compiti cognitivi determinava un cambiamento nell'attività emodinamica cerebrale caratterizzato da un aumento dell'emoglobina totale e di quella ossigenata accompagnato da un decremento di quella deossigenata. Differenze nei pattern di attivazione cerebrale in soggetti adulti sono stati rilevati anche da un altro studio dove sono state trovate diversità tra le regioni frontali e occipitali in relazione alla percezione di stimoli visivi e di una stimolazione motoria (Wolf, Wolf, Toronov, Michalos, Paunescu, Choi & Gratton 2002). In questo studio è stato possibile osservare le modalità di attivazione dell'emoglobina ossigenata e deossigenata all'interno delle diverse regioni allo scopo di comprendere gli effetti dell'attività neurovascolare nella corteccia visiva e motoria. Per gli stimoli visivi è stata mostrata ai soggetti una semplice scacchiera, mentre per quanto riguarda quelli motori i soggetti dovevano muovere la mano (seguendo un movimento "apri-chiudi"). I risultati di

questo lavoro hanno evidenziato una diversità nell'attività emodinamica all'interno delle due differenti regioni. In particolare, nelle aree occipitali i pattern di attivazione dell'emoglobina ossigenata e deossigenata mostrano una correlazione lineare con un aumento della prima e un decremento della seconda. Per quanto riguarda invece la corteccia motoria non è stata evidenziata tale correlazione tra le due attività emodinamiche. Tali risultati sembrano indicare che l'irroramento sanguigno delle regioni occipitali sia differente rispetto a quelle frontali della corteccia motoria: nelle prime il CMRO2 (Cerebral Metabolic Rate of Oxygen) aumenta, mentre nelle seconde sembra restare relativamente invariato.

In uno studio molto recente è stato utilizzato il NIRs per andare ad analizzare i pattern emodinamici in relazione alla percezione del movimento illusorio, allo scopo di valutare se tale strumento fosse in grado di rilevare l'attività cerebrale legata a processi cognitivi così complessi (Hashimoto, Minagawa-Kawai & Kojima, 2006). I risultati hanno evidenziato un'estrema sensibilità del NIRs rispetto a tale tipologia di stimolazioni, rilevando dei differenti pattern di attività emodinamica all'interno di regioni specifiche, quali le aree MT/V5, localizzate nelle regioni occipitali anteriori e in quelle temporali posteriori.

Per quanto riguarda l'applicazione della Near Infrared Spectroscopy nell'analisi dell'attività emodinamica cerebrale, è necessario esaminare la validità di tale tecnica investigativa nell'individuazione e nella rilevazione dell'attività corticale legata a specifici processi di elaborazione sensoriale, come quelli che permettono di discriminare i volti da altre categorie di stimoli. In uno studio Csibra, Henty, Volein, Elwell, Tucker, Meek & Johnson (2004) hanno dimostrato come il NIRs possa essere in grado di individuare i cambiamenti di ossigenazione e deossigenazione in relazione al confronto tra la visione di stimoli "confusi" ("visual noise") e di volti umani in soggetti adulti. Gli autori hanno confrontato i diversi pattern di attivazione cerebrale in adulti e bambini di 4 mesi, mentre osservavano le due tipologie di stimoli. I risultati sono parsi molto interessanti soprattutto per quanto riguarda gli adulti dove sono state evidenziate delle differenze significative sia a livello topografico (cioè di attivazione delle differenti regioni

cerebrali) sia a livello di pattern di attività emodinamica (incremento o decremento della HbO<sub>2</sub> e della Hb) in relazione alla percezione delle differenti tipologie di stimoli. Per quanto riguarda i volti è stato evidenziato infatti un aumento significativo dell'emoglobina ossigenata nelle regioni occipitotemporali tra i 5 e i 15 secondi dopo la presentazione dello stimolo, mentre per l'emoglobina deossigenata è stato trovato un decremento anche se non significativo. Per quanto riguarda invece l'attività emodinamica in relazione ai "visual noise" sono stati trovati pattern opposti di attivazione (con un incremento dell'emoglobina deossigenata e un decremento di quella ossigenata) localizzati nelle regioni frontali. Il confronto tra i due pattern di risposta è risultato quindi significativo: una maggior concentrazione di HbO<sub>2</sub> durante la percezione dei volti all'interno delle regioni occipitali, e un incremento significativo dell'Hb durante gli stimoli "visual noise" nelle regioni frontali. Questo studio evidenzia la capacità del NIRs di investigare il cervello umano durante lo svolgimento di attività cognitive superiori anche in soggetti adulti.

Questi studi hanno analizzato le differenze nell'attivazione cerebrale in risposta a diverse stimolazioni e hanno portato risultati a sostegno che la tecnica NIRs, nonostante sia molto complessa e per certi versi ancora oscura, è in grado di investigare in profondità l'attività cerebrale umana, non solamente su neonati o bambini piccoli ma anche su soggetti adulti che mostrano delle capacità cognitive più complesse.

### **3.9.6 Conclusioni**

In questo capitolo ho voluto descrivere gli aspetti generali dell'utilizzo della tecnica Nirs mentre nel capitolo 5 entrerò maggiormente nel dettaglio sui parametri fisici che riguardano la misurazione dell'attività cerebrale attraverso lo spettro ottico.

## Capitolo 4

### Breve rassegna sulle varie strutture anatomico e funzionali che compongono la testa con particolare approfondimento all'emodinamica dei tessuti biologici in generale.

#### 4.1 Anatomia del cranio

La testa umana è costituita da diversi strati di diverso tipo: pelle, cranio, fluido cerebrospinale ed aree cerebrali.

##### 4.1.1 Pelle

La pelle costituisce una barriera protettiva contro i danni fisici dei tessuti sottostanti, contro invasioni di pericolose sostanze chimiche e batteriche e, attraverso l'attività delle ghiandole del sudore e dei vasi sanguigni, aiuta a mantenere il corpo ad una costante temperatura. La figura seguente, che mostra una sezione trasversale della pelle e del tessuto sottocutaneo, mette in evidenza i diversi strati che compongono il tessuto cutaneo: lo strato più esterno, protettivo, è l'epidermide e lo strato più interno è il dermide. Mentre lo strato più alto dell'epidermide è costituito da cellule morte, il dermide è composto da fibre vascolari e tessuto connettivo. Il tessuto sottostante alla pelle è principalmente costituito da tessuto adiposo (figura 1, 4.1.1).

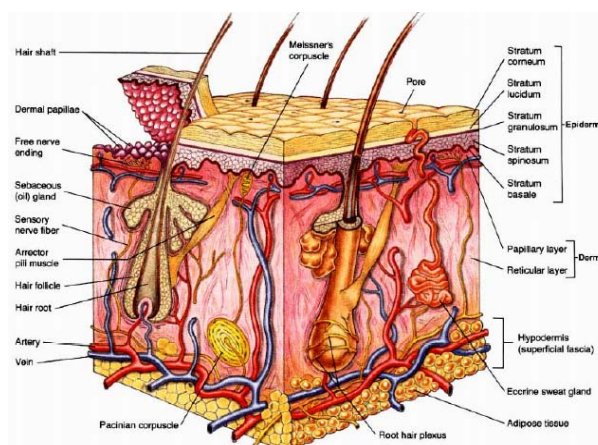


Figura 1 (strati dell'epidermide e tessuti sottostanti)

## 4.1.2 Cranio

Le ossa del cranio, in base alla forma, sono classificate come lunghe, corte, piatte o irregolari. Ossa di differenti tipi contengono proporzioni differenti di due tipi di tessuto osseo: compatto e spugnoso. Mentre il primo ha una struttura uniforme, il secondo è caratterizzato da una struttura simile ad aghi o a pezzi di ossa piani chiamati travecole, i quali formano una rete riempita con midollo osseo. La maggior parte delle ossa del cranio è costituita da due superfici parallele di ossa compatte, con uno strato di osso spugnoso tra le due ed un'alta concentrazione di sangue. Il cranio è una struttura complessa costituita completamente da 22 ossa, che possono essere suddivise in 2 set: ossa craniali e ossa facciali (figura 2, 4.1.2).

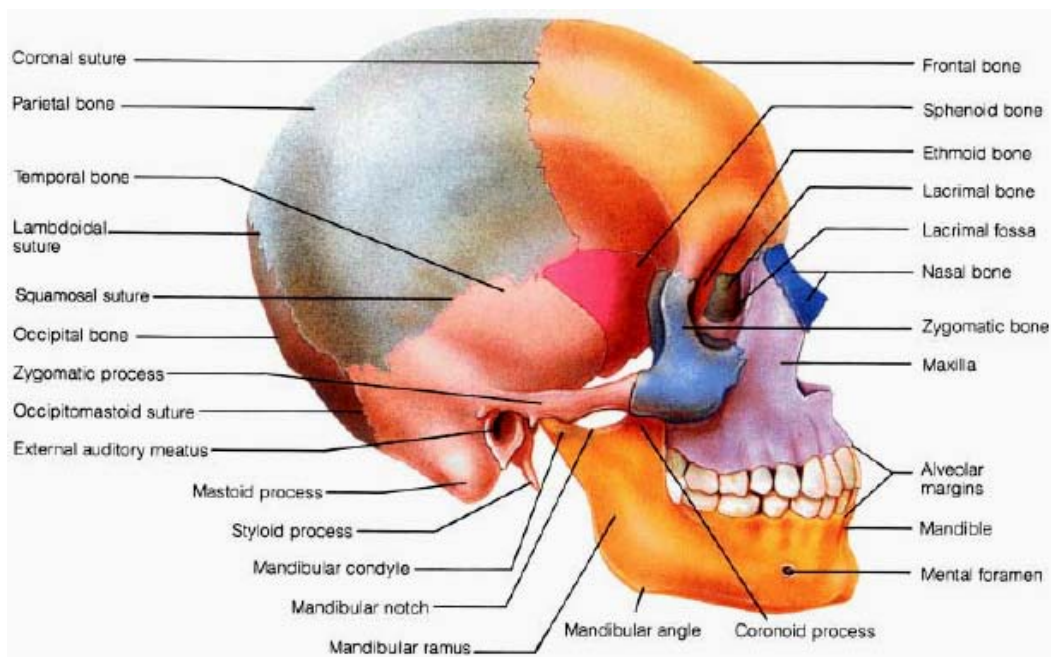


Figura 2 (ossa del cranio)

## 4.1.3 Fluido cerebrospinale

E' un liquido limpido e incolore con composizione simile al plasma sanguigno, viene formato nel plesso coroideo e circola all'interno della membrana aracnoide. Le sue funzioni

principali sono proteggere meccanicamente il cervello assorbendo gli urti e mediare lo scambio di sostanze tra tessuto cerebrale e vasi sanguigni.

#### 4.1.4 Aree cerebrali

Le maggiori zone cerebrali, come riportato in figura, sono: gli emisferi cerebrali, il cervello medio, il tronco cerebrale e il cervelletto (figura 3, 4.1.4).

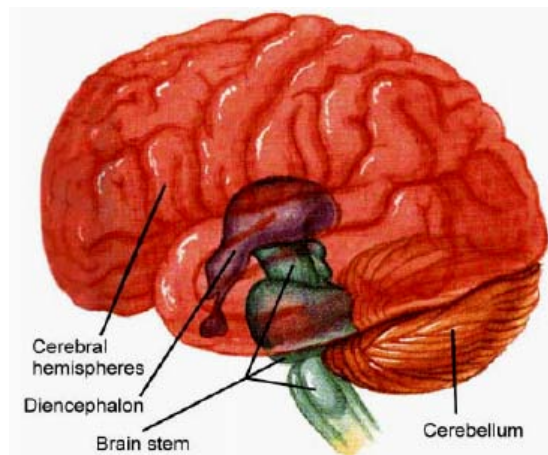


Figura 3 (struttura cerebrale)

#### 4.1.5 Emisferi cerebrali

Sono collocati nella parte superiore del cervello e costituiscono circa l'83% della totale massa cerebrale e sono separati da una fessura longitudinale.

Lo strato superficiale, con spessore di 2-4 mm che circonda circa il 40% della massa totale di materia grigia, costituisce la corteccia cerebrale. La corteccia è responsabile del comportamento consapevole e contiene tre differenti aree funzionali: motoria, sensoriale, e area di connessione (figura 4, 4.1.5).

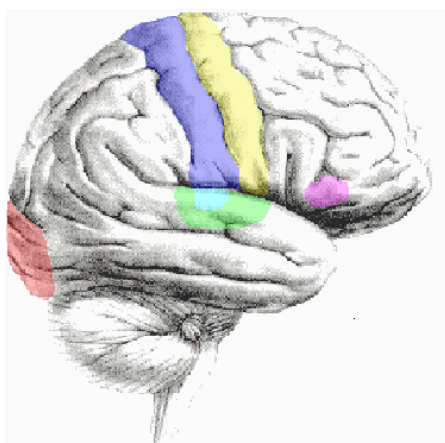


Figura 4 (esempi di aree funzionali degli emisferi cerebrali)

Posta all'interno vi è la materia bianca, responsabile delle comunicazioni tra aree cerebrali e tra corteccia cerebrale e le regioni più basse del SNC, come i nuclei basali, strutture impegnate nel controllo dei movimenti muscolari.

#### **4.1.6 Cervello medio**

E' collocato centralmente all'interno del cervello e consiste in talamo, ipotalamo ed epitalamo, i quali tutti assieme racchiudono il terzo ventricolo cerebrale. Il talamo funge da classificatore e ripetitore per gli input sensoriali che si dirigono verso la corteccia sensoriale e le aree di connessione ed è anche mediatore tra attività motorie, stimoli corticali e memorie. L'ipotalamo, oltre a controllare il sistema nervoso autonomo, è il responsabile per il mantenimento dell'equilibrio omeostatico del corpo, inoltre costituisce una parte del sistema limbico. L'epitalamo consiste nella ghiandola pineale e nel plesso coroideo che serve alla produzione del fluido cerebrospinale.

#### **4.1.7 Tronco cerebrale**

E' una struttura simile al midollo spinale e consiste in materia grigia circondata da tratti di fibre di materia bianca. Le sue maggiori regioni sono il mesencefalo, il ponte e il midollo allungato. Le attività principali svolte da questa sistema sono regolare il ritmo cardiaco e respiratorio e la pressione sanguigna.

#### **4.1.8 Cervelletto**

E' collocato sulla parte posteriore del cranio e rappresenta circa l'11% della massa totale del cervello. Come gli emisferi principali, anch'esso presenta un sottile strato esterno di materia grigia che racchiude materia bianca. Il suo compito principale è trattare gli impulsi inviati dalla corteccia motoria per consentire maggiore coordinazione ai movimenti.

#### **4.2 Emodinamica dei tessuti biologici**

La spettroscopia nel vicino infrarosso (NIRS, Near Infrared Spectroscopy) è una tecnica ottica di imaging per applicazioni mediche fra le più importanti, il cui impiego si è notevolmente sviluppato negli ultimi venti anni. Il crescente interesse che si è creato verso la NIRS è dovuto al fatto che essa permette di ottenere, con una buona risoluzione spaziale e temporale, immagini di tessuti relativi ad organi diversi (tessuti muscolari, cardiaci, cerebrali) e attraverso l'utilizzo di queste immagini possono essere rilevate patologie oppure effettuati studi di carattere funzionale. Altro aspetto fondamentale è quello della totale sicurezza per il paziente, il quale non è sottoposto a radiazioni ionizzanti. Le mappe che si possono ottenere con la spettroscopia nel vicino infrarosso forniscono essenzialmente la variazione di concentrazione di ossigeno nel sangue all'interno dei tessuti, in particolare i muscoli o il cervello, in conseguenza di stimoli di carattere



motorio o visivo. Per comprenderne il funzionamento è indispensabile accennare ai principi di base che regolano l'emodinamica dei tessuti biologici che sottostanno la connessione neurovascolare e considerare le molteplici funzioni del sangue e del sistema circolatorio degli organismi multicellulari qual è l'uomo. Nel seguente capitolo si approfondiranno alcuni aspetti della fisiologia di base dei mammiferi, evidenziando il legame tra produzione d'energia e richiesta d'ossigeno in processi come la respirazione cellulare e ponendo l'attenzione sul sistema vascolare, fondamentale per il rifornimento dei tessuti delle sostanze necessarie alla sopravvivenza.

#### **4.2.1 Basi di fisiologia**

Con l'aiuto di particolari enzimi, una cellula degrada sistematicamente molecole organiche complesse ricche di energia in prodotti di rifiuto più semplici e con un minore contenuto di energia.

Parte dell'energia così liberata può essere utilizzata per compiere lavoro e il resto viene dissipato in calore. I processi che degradano le molecole complesse sono detti catabolici e possono avvenire sia in assenza di ossigeno (fermentazione) che in presenza di ossigeno (respirazione cellulare). Il processo più efficiente a cui può essere attribuito circa il 95% dell'energia totale prodotta dalla cellula è la respirazione cellulare, nel quale l'ossigeno viene consumato come uno dei reagenti insieme al combustibile organico. Questo processo può essere complessivamente schematizzato come segue:

Composti organici + ossigeno = biossido di carbonio + acqua + energia

La respirazione cellulare, precisamente, è il prodotto complessivo dei seguenti tre stati metabolici:

- Glicolisi
- Ciclo di krebs
- Catena di trasporto degli elettroni e fosforilazione ossidativa

La caratteristica in comune delle tre fasi è la continua produzione di energia anche se con procedimenti diversi.

I primi due stadi, glicolisi e ciclo di Krebs, sono le vie cataboliche che decompongono i composti organici come il glucosio. Infatti la glicolisi scinde il glucosio in due molecole di un composto noto come piruvato, scissione che viene poi ultimata all'interno dei mitocondri dal ciclo di Krebs, che decompone il piruvato in biossido di carbonio. Alcune delle tappe di queste prime due fasi della respirazione sono caratterizzate da reazioni di ossido-riduzione. Nella terza fase della respirazione, la catena di trasporto degli elettroni accetta elettroni dai prodotti di demolizione dei primi due stadi e li trasferisce da una molecola all'altra, solitamente proteica; al termine della catena gli elettroni si legano con gli ioni idrogeno e con ossigeno molecolare per formare acqua. A questo scopo i composti organici, principalmente utilizzati in queste reazioni, sono caratterizzati da un elevato numero di atomi di idrogeno. L'ossidazione del composto organico, dovuta al passaggio dell'idrogeno all'ossigeno per formare acqua, comporta infatti un cambio di stato da parte degli elettroni che contribuiscono al legame; a causa di ciò viene liberata energia che sarà poi utilizzata per la sintesi dell'adenosintrifosfato (ATP), che risulta la fonte diretta di energia che alimenta il lavoro cellulare. Il modo in cui la cellula ricava l'energia dall'ATP risiede nella presenza del legame covalente tra i gruppi fosfato dell'ATP, legame che per idrolisi viene rotto liberando 7kcal per mole di ATP, in maniera completamente reversibile. Sfortunatamente questa reazione catabolica ha un'efficienza in energia trasferita solo del 40% mentre il resto viene dissipato in calore.

Tipicamente circa il 95% del glucosio è ossidato tramite fosforilasi e il rimanente 5% è consumato anaerobicamente tramite glicolisi.

### 4.3 Il sangue

Il sangue è il mezzo principale attraverso il quale le sostanze sono trasportate da una parte all'altra del corpo. Le sostanze nutrienti come il glucosio, aminoacidi, acidi grassi, elettroliti ed acqua sono assorbite dal tratto gastrointestinale e trasportate ai vari tessuti del corpo. L'ossigeno è assorbito dal sangue mentre passa attraverso i polmoni ed è trasportato ai tessuti che respirano. L'anidride carbonica prodotta nel corso della respirazione cellulare, è assorbita dal sangue circolante nei tessuti e trasportata ai polmoni dove viene eliminata con l'aria espirata. Inoltre, altre sostanze di scarto del metabolismo cellulare come l'urea, l'acido urico e l'acqua in eccesso, sono trasportate dal sangue ai reni ove vengono escrete. Gli ormoni ed altri messaggeri chimici prodotti nel corpo umano sono trasportati dal sangue dalle sedi di produzione alle cellule bersaglio. Il metabolismo del corpo produce una notevole quantità di calore come sottoprodotto ed il calore in eccesso deve essere disperso nell'ambiente per prevenire il surriscaldamento. Il sangue trasporta il calore dal nucleo interno del corpo (core) alle vie aeree superiori ed alla cute, ove esso viene disperso.

Il sangue contribuisce a mantenere l'omeostasi dell'organismo essendo un veicolo per il trasporto di sostanze ed un mezzo per la comunicazione tra varie cellule, tessuti ed organi del corpo umano. Il sangue non è un fluido corporeo come le lacrime, la saliva e l'urina; piuttosto esso è un tessuto connettivo vivente il cui volume è costituito per il 45% da elementi cellulari ed il 55% da fluido intercellulare, quindi approssimativamente, da 5 milioni di globuli rossi (eritrociti) per microlitro, 7 mila globuli bianchi (leucociti) per microlitro e 300 mila piastrine (trombociti) per microlitro, sospesi in 3 litri di fluido intercellulare detto plasma. Il plasma è composto per il 93% da acqua e per il 7% da soluti, la maggior parte dei quali (86%) è rappresentata da proteine. I globuli rossi; quelli bianchi e le piastrine originano da cellule staminali emopoietiche, totipotenti, che si trovano principalmente nel midollo osseo rosso (parte spongiosa del midollo osseo). La capacità del sangue di trasportare l'ossigeno dipende dalla concentrazione di emoglobina. Gli eritrociti contengono emoglobina, una molecola di pigmento che conferisce alla cellula un colorito rosso

pallido. Ciascun eritrocita contiene da 200 a 300 milioni di molecole di emoglobina che contribuiscono per circa un terzo alla massa del globulo rosso. L'emoglobina si lega e si dissocia molto rapidamente con l'ossigeno e l'anidride carbonica ed è responsabile della capacità del globulo rosso di trasportare questi gas. L'emoglobina svolge anche un importante ruolo come sostanza tampone nella difesa dell'organismo contro le variazioni di concentrazione degli ioni idrogeno (pH).

La molecola di emoglobina consiste di una parte proteica detta globina, cui sono attaccati quattro gruppi eme. Ciascun gruppo eme contiene un atomo di ferro al quale può legarsi, o dal quale può dissociarsi, una molecola di ossigeno. Ciascuna molecola di emoglobina può trasportare fino ad un massimo di quattro molecole di ossigeno. Quando il sangue passa attraverso i polmoni, l'emoglobina si satura di ossigeno, formando ossiemoglobina ed assumendo un brillante colorito rosso. In seguito, quando il sangue attraversa i tessuti del corpo, una parte dell'ossigeno si dissocia dall'emoglobina. Si forma emoglobina ridotta ed il colore del sangue diviene rosso scuro. Il sangue normale contiene approssimativamente 15 grammi di emoglobina per decilitro (100 ml) di sangue intero (cellule, piastrine e plasma). I valori di normalità riferiti agli adulti sono: 16,0 g/dl, + 2,0 g/dl per i maschi e 14,0 g/dl, + 2,0 g/dl per le femmine. Circa il 98% dell'ossigeno trasportato dal sangue è rappresentato da ossiemoglobina. La capacità di trasporto di ossigeno del sangue è definita come la quantità di ossigeno che è in grado di trasportare l'emoglobina presente in 100 ml di sangue intero. Ciascun grammo di emoglobina può combinarsi con 1,34 ml di ossigeno. Poiché il sangue normale contiene circa 15 grammi di emoglobina per decilitro, la capacità di trasporto di ossigeno del sangue di un adulto normale è di circa 20 ml di ossigeno per decilitro ( $15 \text{ g/dl} \times 1,34 \text{ ml O}_2/\text{g} = 20,1 \text{ ml O}_2/\text{dl}$ ). Nel sangue umano i due tipi di emoglobina di nostro interesse sono: il tipo A negli adulti ed il tipo F nel feto. Sono le diversità nella molecola della globina che danno origine ai diversi tipi (mentre i gruppi eme sono uguali in tutti i tipi di emoglobina). La parte globinica dell'emoglobina consiste di due paia di catene peptidiche simili e ciascun paio è indicato con lettere greche: alfa ( $\alpha$ ), beta ( $\beta$ ), gamma ( $\gamma$ ) o delta ( $\delta$ ). Un gruppo eme è legato a ciascun  $\alpha$  e  $\beta$  delle quattro catene. Il 96% dell'emoglobina dell'adulto è di tipo A1, costituita da due catene alfa e da due catene

beta. Il 2% dell'emoglobina dell'adulto è di tipo A2, costituita da due catene alfa e da due catene delta, ed il 2% è di tipo F, costituito da due catene alfa e da due catene gamma. L'emoglobina F è il tipo predominante nel sangue fetale ed ha un' affinità maggiore per l'ossigeno rispetto a quella dell'emoglobina dell'adulto. Questa maggior affinità permette ai globuli rossi fetali di assorbire un' adeguata quantità di ossigeno ad una PO<sub>2</sub> (pressione parziale di O<sub>2</sub>) più bassa prevalente nell' ambiente fetale. Alla nascita, quando i polmoni divengono l'organo di scambio gassoso del neonato, l'emoglobina A1 inizia a sostituire l'emoglobina F. Nell'arco di sei mesi dalla nascita la sostituzione è praticamente completa. L'eritropoiesi è la formazione degli eritrociti a partire dalle cellule staminali emopoietiche totipotenti. Nel feto i globuli rossi si formano da cellule staminali nel sacco vitellino, nel fegato, nella milza e nel midollo osseo rosso. Nell'adulto, la produzione di globuli rossi è confinata al midollo rosso dell'omero (osso del braccio), del femore (osso della coscia), delle coste e dello sterno (ossa del torace), delle scapole (ossa piatte delle spalle), del cranio, delle vertebre e del bacino. Il midollo osseo dell'adulto produce ogni giorno circa 230 miliardi di globuli rossi e in caso di necessità può aumentarne la produzione fino a sei volte. Un eritrocita rimane in vita per circa 4 mesi, trascorsi i quali viene rimosso dal sangue e distrutto dai macrofagi della milza, del fegato e del midollo. Normalmente, la velocità di distruzione è uguale a quella di produzione; in tal modo il numero di eritrociti circolanti rimane praticamente costante. Per l'appropriata formazione dei globuli rossi e dell'emoglobina, sono necessarie parecchie sostanze: amino acidi, ferro, rame e sono essenziali le vitamine B2 (riboflavina), B12 (cianocobalamina), piridossina e acido folico. La deficienza di ciascuna di queste sostanze può dar luogo ad anemia. Il ferro è richiesto per la produzione dell'eme; infatti circa i due terzi del contenuto in ferro dell'organismo sono reperibili nell' emoglobina. La maggior parte del ferro rimanente è immagazzinato come ferritina, un complesso ferro-proteico presente nel fegato, nell'epitelio intestinale, nella milza e nel midollo osseo. Il ferro delle riserve può essere reso disponibile per la sintesi dell'emoglobina, attraverso una proteina detta transferrina, che si trova nel plasma. La transferrina si combina con il ferro che è stato assorbito a livello dell'intestino o liberato dalle riserve e lo trasferisce agli eritrociti

in via di sviluppo nel midollo osseo. La transferrina trasporta anche il ferro recuperato dagli eritrociti, giunti al termine della loro vita, nel midollo osseo ove è riutilizzato per la sintesi dell'emoglobina, o nel fegato per esservi immagazzinato come riserva.

#### **4.4 Scambio molecolare.**

I capillari sono una rete estesa di vasi sanguigni a parete molto sottile che consente uno scambio diffusionale di molecole estremamente rapido. Ciascun capillare é lungo solo 1 mm ma tutti insieme rappresentano il più esteso punto di comunicazione tra liquido interstiziale e sangue. Gran parte delle cellule dell'organismo si trovano ad una distanza dai capillari inferiore agli 0,02 mm. Grazie a queste distanze così brevi, le molecole possono muoversi per diffusione con grande rapidità dalla cellula al capillare più vicino. Una seconda caratteristica dei capillari, che li rende adatti al compito dello scambio di molecole, è che la parete di questi vasi ha lo spessore di un solo strato cellulare. Ciò facilita ulteriormente lo scambio diffusionale rapido tra sangue e liquido interstiziale. I processi di scambio che si verificano a livello dei capillari sono il risultato di un equilibrio dinamico tra forze diffusionali, osmotiche e idrostatiche. I capillari si trovano al centro del sistema del microcircolo che comprende arteriole, capillari e venule. I capillari (diametro 5-10 micron) si ramificano a partire dalle arteriole e terminano svuotandosi nelle venule. Sebbene i capillari veri e propri non contengano muscolatura liscia, in molti casi all'inizio di essi si trova un piccolo manicotto di muscolo liscio che viene chiamato sfintere precapillare. L'entità del flusso di sangue attraverso i capillari è stabilita dal grado di contrazione della muscolatura liscia delle arteriole e dello sfintere precapillare. (vasomotilità). La vasomotilità è fortemente influenzata dallo stato metabolico del tessuto. Per esempio, durante l'esercizio fisico, aumenta il numero dei capillari che, aperti gli sfinteri precapillari, si dilatano per incrementare il flusso di sangue che perfonde il tessuto. La parete è formata da muscolatura liscia. Le cellule endoteliali, sottili e appiattite sono unite tra loro ai margini come i quadranti di una trapunta. Tra le cellule endoteliali sono presenti

piccole fenestrazioni che consentono il passaggio di molecole. Le dimensioni e il numero di questi pori endoteliali variano notevolmente da tessuto a tessuto. I capillari del cervello, per esempio, non presentano pori e questo rende conto dell'impermeabilità della "barriera emato-encefalica" ad una varietà di sostanze. Ci sono fondamentalmente tre diversi meccanismi attraverso i quali le sostanze possono attraversare la parete dei capillari. La diffusione rappresenta il meccanismo di gran lunga più importante per lo scambio di acqua e soluti. La velocità dello scambio di acqua che si verifica per diffusione, risulta 100 volte maggiore della velocità del flusso di sangue lungo il capillare.

Poiché l'acqua si muove attraverso la parete del capillare in entrambe le direzioni, in totale non si verificano guadagni o perdite significative dal circolo per diffusione; tuttavia, la velocità dello scambio è elevatissima. Naturalmente, oltre all'acqua, anche molte delle molecole disciolte nel sangue e nel liquido interstiziale vengono scambiate per diffusione. Il sangue che entra nei capillari sistemici presenta una concentrazione relativamente alta di ossigeno e glucosio e una concentrazione relativamente bassa di anidride carbonica. Le concentrazioni di ossigeno e di glucosio nel liquido interstiziale sono più basse perché tali sostanze vengono continuamente consumate dalle cellule. Il metabolismo di queste sostanze provoca la produzione di anidride carbonica che diffonde dalle cellule nello spazio interstiziale. In conseguenza dei gradienti di concentrazione che si creano tra sangue e liquido interstiziale, si verifica un movimento netto di ossigeno e glucosio in uscita dai capillari e un movimento netto di anidride carbonica in ingresso nei capillari. La via seguita da una data molecola è determinata dalla sua solubilità relativa in acqua e nei lipidi. Molecole che si disciolgono con difficoltà nei lipidi (per esempio  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Cl}^-$  e glucosio) diffonderanno con maggiore probabilità attraverso i pori delle cellule endoteliali.

Molecole come l'ossigeno, l'anidride carbonica e l'urea, maggiormente liposolubili, possono diffondere direttamente attraverso le membrane delle cellule endoteliali. Poiché i pori occupano meno dell'1% dell'area della parete del capillare, la superficie disponibile per la diffusione di sostanze liposolubili è più di 100 volte maggiore di quella a disposizione delle sostanze non liposolubili. Si può pertanto capire come il meccanismo della diffusione sia particolarmente adatto

per lo scambio rapido e continuo di ossigeno e anidride carbonica, che sono entrambe sostanze liposolubili. I fattori fisici che contribuiscono allo scambio diffusionale sono:

- la breve distanza che le molecole devono percorrere data la vicinanza tra cellula e capillare (20 micron);
- l'enorme area superficiale totale che le pareti dei capillari coprono (400 metri quadrati);
- la velocità relativamente lenta del flusso di sangue nei capillari che è inversamente proporzionale all' area totale della sezione trasversa del vaso (o dei vasi) attraverso cui il sangue sta scorrendo.

In pratica, possiamo vedere in azione questo principio quando osserviamo il flusso d' acqua che scorre in un fiume. La velocità è maggiore quando il letto del fiume si restringe (come nelle rapide) e diventa minore quando il letto si allarga; il flusso totale, tuttavia, è lo stesso in entrambi i punti. La velocità del flusso ematico nei capillari varia tra 0,1 e 1 mm/sec, mentre è di 40 cm/ sec nell' aorta. La drammatica riduzione della velocità del flusso nei capillari comporta un sostanziale aumento del tempo di scambio tra sangue e liquido interstiziale.

I globuli rossi hanno un diametro di circa 7-9  $\mu\text{m}$ , sono privi di nucleo e contengono l'emoglobina che tramite il ferro consente l'effettivo trasporto di ossigeno, che è la funzione principale di queste particelle. Normalmente la frazione di volume di globuli rossi nel sangue è 40-45%; al di sotto di questo valore la totale quantità di ossigeno risulta ridotta limitando così il processo metabolico, invece al di sopra del suddetto valore la frazione di globuli rossi risulta troppo elevata perché il sangue attraversi in modo scorrevole il micro sistema vascolare.

I globuli bianchi hanno un diametro compreso tra 10-20 $\mu\text{m}$  sono più rigidi dei globuli rossi e contengono un nucleo. Il loro compito fondamentale è provvedere da sistema immunitario di difesa in modo da proteggere l'organismo da microbi e tossine.

Le piastrine hanno forma di dischi con diametro di 2-3 $\mu\text{m}$  importanti per la trombogenesi: i trombociti (le piastrine) riducono la perdita di sangue promuovendone la coagulazione e contribuendo alla riparazione dei vasi sanguigni lesionati. La frazione di volume dovuta a piastrine e globuli bianchi è circa 1%.



Il plasma, parte liquida del sangue, consiste in una miscela di sostanze sia organiche sia inorganiche e contiene anche un gran numero di elettroliti in aggiunta a proteine e rifiuti dei processi metabolici.

#### 4.5 Circuito cardiovascolare

Il sistema cardiovascolare è, da un punto di vista idraulico, un sistema bilanciato, Ciò è dovuto al fatto che il volume di sangue deve sempre eguagliare il volume vascolare.

Uno sbilanciamento di questo può provocare o ipertensione o un collasso vascolare.

E' possibile descrivere il flusso di sangue attraverso il corpo mediante il seguente schema (figura 5, 4.5)

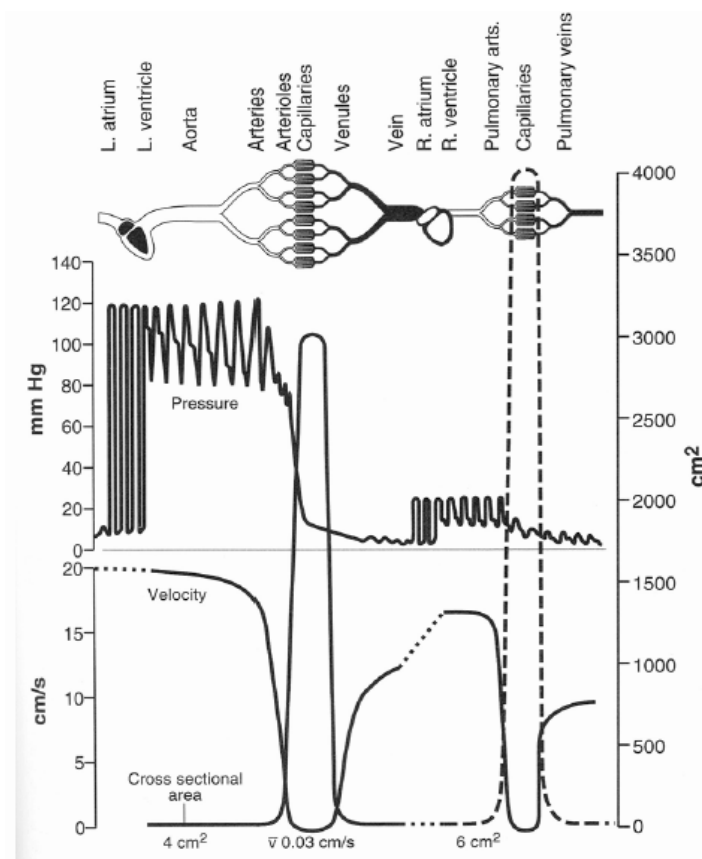


Figura 5 (circuito cardiovascolare)

Il sistema cardiovascolare include cuore e sistema circolatorio e serve a portare il sangue dal cuore ai tessuti e poi indietro al cuore riattraversando tutto il sistema circolatorio e attraversando le vie polmonari.

Il sistema vascolare nel corpo umano consiste di circolazione arteriosa, venosa, capillare e circolazione linfatica (in questo lavoro non verrà presentato il sistema di circolazione linfatica perché non rientra negli argomenti fondamentali per la giusta comprensione dello strumento sotto indagine).

Il sistema di circolazione arteriosa è composta da aorta, arterie e arteriole. Il sistema di circolazione venosa è composto da vene e venule. Il cuore fornisce la forza motore che pompa il sangue attraverso il sistema, le arterie trasportano il sangue dal cuore ai tessuti e le vene lo riportano al cuore. Il sistema cardiovascolare mantiene un'adeguata circolazione in tutte le parti del corpo sotto differenti condizioni e risulta regolato da diversi fattori interagenti. Esistono due principali sistemi di regolazione: sistema intrinseco e sistema estrinseco.

Il sistema intrinseco consiste di

1. autoregolazione muscolare (sensibile a tensione di parete e pressione di perfusione);
2. regolazione metabolica (sensibile alle percentuali di CO<sub>2</sub>, O<sub>2</sub>, H<sup>+</sup>);
3. regolazione umorale.

Il sistema estrinseco consiste di:

1. controllo nervoso – sistema simpatico e para simpatico (per mezzo di mediatori come noradrenalina e acetilcolina);
2. controllo umorale (attraverso mediatori come adrenalina).

Una parte importante della circolazione è il sistema di capillari, che consiste in una rete di molti e piccoli canali che uniscono il lato arterioso con il lato venoso del sistema circolatorio (figura 6, 4.5).

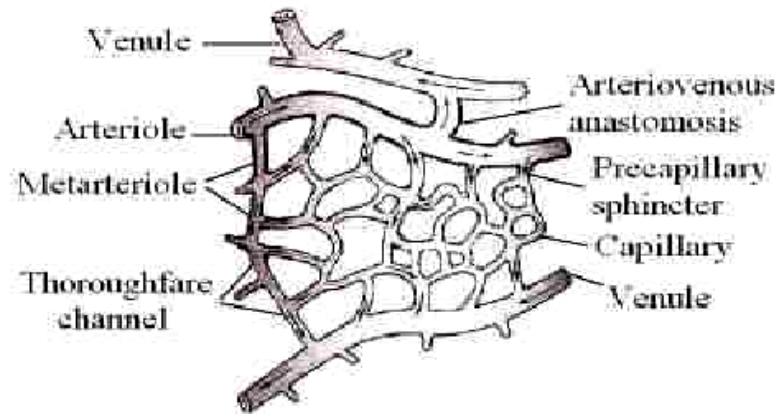


Figura 6 (sistema circolatorio)

La rete di capillari ha il compito di facilitare la diffusione dell'ossigeno nei tessuti e lo scambio di numerose altre sostanze, come acqua e piccole macromolecole.

Internamente ai muscoli scheletrici si trovano circa 20-30 capillari per arteriola, che scorrono parallelamente alle fibre muscolari, di questi si può affermare che poco più del 25% contiene sangue che fluisce mentre il rimanente 75% contiene sangue "fermo" e ciò corrisponde ad avere circa 15 capillari per arteriola con il compito di trasportare sangue alla venula corrispondente.

Inoltre il suddetto numero risulta dipendere dall'attività del tessuto, in pratica il numero di capillari attivi aumenta con l'attività del tessuto. In questo modo, il volume può crescere e decrescere a seconda del flusso di sangue che attraversa un numero variabile di capillari non-distensibili.

#### 4.6 Trasporto e diffusione dei gas

Una delle più importanti funzioni che svolge il sangue è la consegna e rimozione di due gas fondamentali al metabolismo, come ossigeno e biossido di carbonio.

La rete di capillari ha specifiche caratteristiche utili a compiere specifiche funzioni come facilitare la diffusione di sostanze verso e da i tessuti. Questo è dovuto alle pareti dei capillari che sono parzialmente permeabili. La quantità di fluido che attraversa i capillari dipende dalla

permeabilità e superficie delle pareti e dal gradiente di pressione idrostatica e osmotica tra il sangue e il fluido interstiziale.

Dal gradiente di pressione idrostatica dipende l'ultrafiltrazione del fluido dai capillari al tessuto mentre dal gradiente di pressione d'osmosi dipende il processo di riassorbimento del fluido. Nella maggior parte dei tessuti si trova un leggero eccesso di ultrafiltrazione sul riassorbimento e questo stato viene chiamato equilibrio di Starling.

#### 4.6.1 Ossigeno

L'ossigeno nel sangue viene trasportato in due forme: legato chimicamente alle molecole di emoglobina dissolte nel citosol dei globuli rossi, e dissolto fisicamente nel plasma. Al livello del mare, il sangue può contenere 20cc di O<sub>2</sub> per decilitro, di cui 0.3cc sono fisicamente dissolti e la rimanente parte è chimicamente legata all'emoglobina. Sebbene la quantità di O<sub>2</sub> dissolta nel plasma è una funzione lineare della pressione parziale dell'ossigeno, la relazione tra saturazione dell'emoglobina ossigenata e la pressione parziale dell'ossigeno non è lineare e varia in maniera fisiologicamente significativa in funzione del pH, pressione parziale del CO<sub>2</sub> e della temperatura.

Più precisamente, come viene mostrato in figura, un aumento del pH e una diminuzione della pressione parziale del CO<sub>2</sub> e della temperatura causano uno shift a sinistra nella normale curva di saturazione (segnata in rosso) e uno shift a destra nel caso contrario (figura 7, 4.6.1).

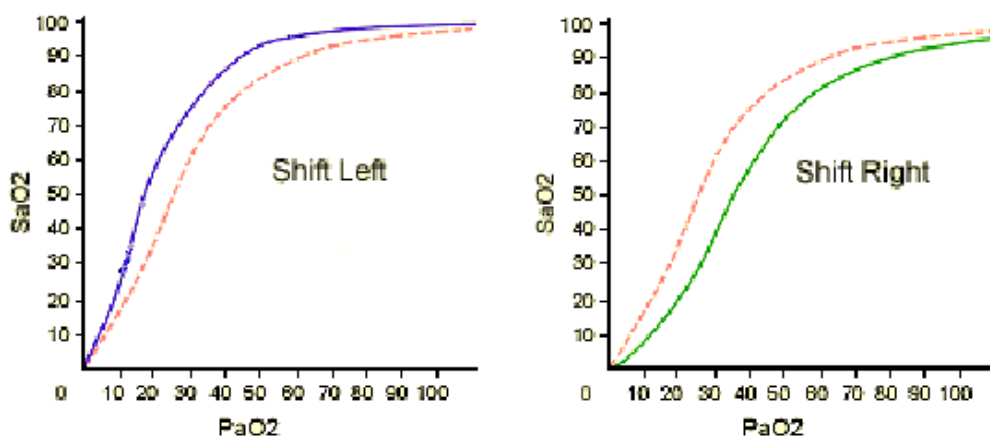


Figura 7 (relazione non lineare tra saturazione di emoglobina e pressione di ossigeno)

#### 4.6.2 Biossido di carbonio

Differentemente dall'ossigeno il CO<sub>2</sub> è trasportato nel sangue in diverse forme. Circa il 70% è in forma di ione bicarbonato, contenuto dentro i globuli rossi. Quasi il 10% viene trasportato in soluzione fisica, dissolto nel plasma. Il rimanente 20% viene trasportato sotto forma di amminoacidi e grassi.

#### 4.7 Fattori che influenzano il flusso sanguigno

Il flusso di liquidi attraverso tubi è governato dalle proprietà di viscosità dei fluidi. La viscosità rappresenta l'attrito tra strati adiacenti di fluidi, strettamente dipendente dall'ematocrito cioè la percentuale di elementi corpuscolati presenti nel sangue (globuli rossi, globuli bianchi e piastrine. Figura 8, 4.7).

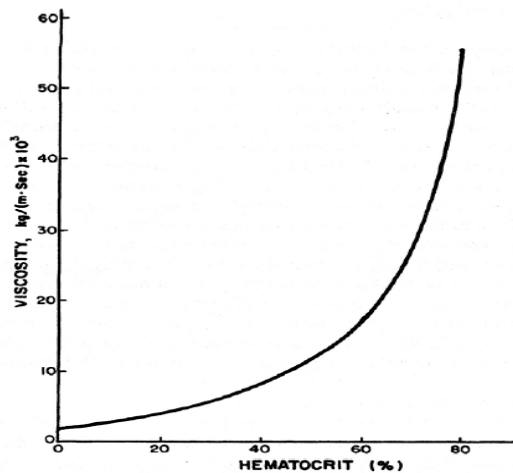


Figura 8 (relazione tra percentuale di ematocrito e viscosità sanguigna)

In particolare per i vasi abbastanza grandi, un aumento dell'ematocrito causa un considerevole aumento di viscosità. Nei vasi con una sezione sotto i 100 µm una diminuzione del

diametro causa un decremento della viscosità.

La resistenza totale al flusso risulta minore quando i vasi sono sistemati in parallelo rispetto alla sistemazione in serie. Nel sistema vascolare, arterie, arteriole, capillari, venule e vene si susseguono in serie e la resistenza totale di questi vasi è:

$$R_{\text{serie-total}} = R_A + R_a + R_c + R_v + R_V.$$

Mentre per i capillari si ha un'organizzazione in parallelo:

$$1/R_{\text{parallel-total}} = 1/R_1 + 1/R_2 + \dots + 1/R_N.$$

La maggiore resistenza al flusso è dovuta alle arteriole, che contribuiscono al 40% della resistenza periferica totale, il contributo dei capillari è circa il 20%, il 15% quello del sistema venoso e il 25% quello delle arterie. La rigidità di ogni materiale può essere caratterizzata dal suo modulo elastico di Young (E). La distensibilità dei vasi sanguigni è relativa alla rigidità delle pareti. Una proprietà delle pareti vascolari che discende dalla distensibilità e risiede nelle fibre elastiche è la "Vascular compliance" (C) ed è data dalla seguente formula:

$$C = \frac{\Delta V}{\Delta P} = \frac{\Delta d}{d \cdot \Delta P} = \frac{2\pi r^3}{E \cdot L}$$

dove  $\Delta V$  è la variazione del volume di sangue,  $\Delta d$  la variazione del diametro del vaso,  $\Delta P$  la pressione trasmurale definita come la differenza tra pressione interna ed esterna esercitata al vaso ed E il modulo elastico.

Poiché i vasi sanguigni non sono tubi rigidi il sangue fluirà in maniera differente in diversi vasi sanguigni ed il flusso dipenderà dalle proprietà elastiche delle pareti, lo spessore e la pressione del sangue. A causa di ciò e alle elevate pressioni esterne ai vasi, è possibile che in un piccolo vaso non fluisca del sangue fino a che non si raggiunge un determinato valore di pressione trasmurale

che permette l'apertura del vaso stesso. Questa pressione è chiamata pressione critica di chiusura solitamente variabile in un range tra 10mmHg e 25mmHg e dipende dal raggio, quindi aumenta quando il vaso viene ristretto e diminuisce quando è dilatato. Quando, invece, la pressione nei capillari è molto più elevata rispetto la pressione critica di chiusura, avviene l'apertura dello sfintere capillare all'interno della rete microvascolare (capillari), in questo modo si ottiene un aumento nel numero di capillari attivi.

Per un soggetto sano e di giovane età, la pressione sanguigna nelle arterie varia da un picco di 120 mmHg (sistole) a un minimo di 80 mmHg (diastole) e varia a seconda che sia un vaso con diametro più o meno grande. Alla fine delle arteriole la pressione scende intorno al valore di 30mmHg, fino a 15 mmHg nei capillari e a 1-2 mmHg nelle vene. Nelle arteriole il flusso cambia progressivamente da pulsatile a non-pulsatile. Nei capillari e nelle vene il flusso è non-pulsatile.

Considerando tutti i fenomeni fino ad ora esposti, molte ricerche tentano di trovare modelli matematici per meglio descrivere la circolazione nei muscoli scheletrici; in generale il modo migliore per rappresentare il sistema vascolare è dato dalla similitudine con un circuito elettrico, dove l'attrito tra il sangue e le pareti del vaso è espresso come una resistenza elettrica, la distensibilità come una capacità elettrica e la massa di sangue che attraversa il vaso è considerata un'induttanza. In questo caso, il circuito micro-vascolare è modellato come una ripetuta rete parallela di circuiti elettrici con differenti geometrie.

#### **4.8 Emodinamica globale: regolazione della pressione sanguigna**

La pressione sanguigna deve essere mantenuta al di sopra di un determinato valore in modo da superare il valore della pressione esterna esercitata sul vaso e quindi mantenere l'abilità di perfusione per tutti i tessuti in tutto il corpo.

Intuitivamente, questo processo non è differente dal mantenere la pressione di acqua per una grande città, infatti sono verificate molte delle stesse situazioni:

- la richiesta del consumatore varia con il momento del giorno e con il livello di attività;
- l'acqua è consumata a differenti altezze e quantità;
- la pressione deve essere mantenuta malgrado rottura tubature, siccità e altri inaspettati eventi;
- l'acqua superflua deve essere facilmente restituita anche contro la forza di gravità.

Allo scopo di affrontare un simile discorso per il fabbisogno fisiologico, i mammiferi hanno sviluppato un complesso sistema di feedback. I recettori di pressione, siti nel seno carotidale e nell'arco aortico, rilevano la pressione istantanea e inviano queste informazioni al cervello. Il cervello invia il segnale di controllo, attraverso nervi autonomi, al cuore e al sistema vascolare per mantenere lo stato normotensivo. La rappresentazione schematica di retroazione del sistema cardiovascolare può essere rappresentato come nella figura seguente (figura 9, 4.8).

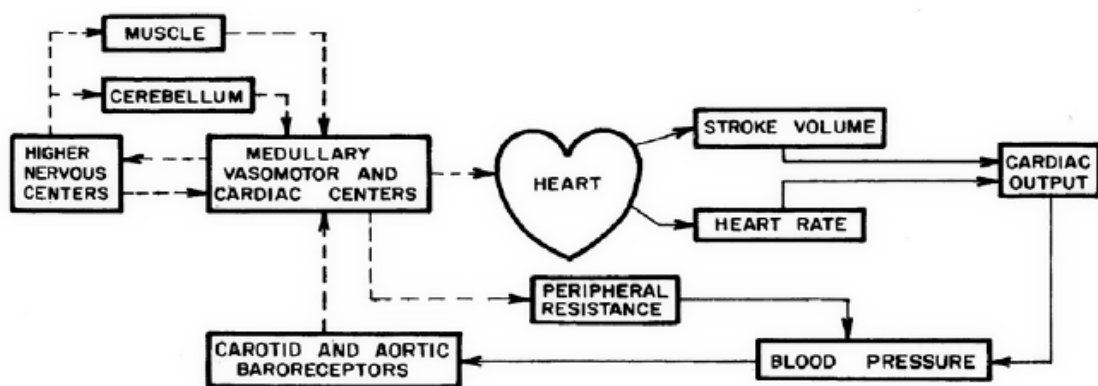


Figura 9 (rappresentazione schematica di retroazione del sistema cardiovascolare)



## Capitolo 5

### La spettroscopia nel vicino infrarosso: principi di funzionamento in relazione all'emodinamica tissutale

#### 5.1 Introduzione

Il cervello è l'organo del corpo umano più complesso e da sempre crea non poche difficoltà nella sua comprensione. Esso è costituito da centinaia di miliardi di unità base, i neuroni, ognuno dei quali è connesso con migliaia di altri. I neuroni sono delle cellule specializzate che processano e trasmettono le informazioni rilasciando i neurotrasmettitori (messaggeri chimici) e lanciando dei segnali elettrici lungo le fibre nervose.

I neuroni richiedono molta energia per una varietà di funzioni, tra cui la biosintesi, il riassorbimento dei neurotrasmettitori e il mantenimento dei gradienti ionici. Il fabbisogno d'energia aumenta con l'aumentare dell'attività neurale. La fonte energetica di questi processi cellulari è l'ATP (adenosinatrifosfato) e in assenza di una sintesi continua, le scorte di ATP si esauriscono in fretta, quindi il sistema necessita di un mezzo per il continuo rifornimento: il sangue.

L'anatomia del cervello e il sistema vascolare sono ben strutturati per questo tipo di distribuzione: il neuropilo, dove si trova gran parte delle sinapsi, presenta la più alta densità capillare, ed è in questa regione che si verifica il più grande incremento del flusso sanguigno durante l'attività neurale. I meccanismi esatti mediante cui viene mediato l'aumento del flusso sanguigno con l'attività neurale sono sconosciuti. L'aumento del flusso nei capillari potrebbe risultare sia dalla dilatazione dei capillari, sia da un aumento della velocità del sangue nei vasi.

Nel determinare quali regioni sono attive e durante quali compiti, stiamo iniziando a capire come il cervello suddivide compiti cognitivi complessi in elementi più semplici. Gli esperimenti fino ad ora condotti hanno fornito delle informazioni attendibili e riproducibili sui centri dell'attività neurale durante compiti che vanno dalla vista al linguaggio, alla memoria, all'abilità d'apprendimento, al movimento, ecc. Ciò dimostra che il cervello non è un organo omogeneo, nel

quale tutti i processi cognitivi impiegano gli stessi gruppi di neuroni, ma è piuttosto una struttura molto organizzata con unità funzionali specifiche.

Ponendo l'accento su quanto detto fino ad ora, l'attività neurale aumenta il consumo di glucosio e ossigeno in quelle parti del cervello dove l'attività ha preso luogo. E' giusto quindi, affermare, che una delle conseguenze dell'attività cerebrale è l'aumento del flusso di sangue nel cervello per compensare l'alto consumo d'ossigeno richiesto dal lavoro dello stesso. Un altro effetto è l'aumento del volume del sangue nel tessuto nervoso, ma riguardo a quest'argomento è meglio non sbilanciarsi dal momento che gli stessi ricercatori non sono del tutto sicuri su dove precisamente si determini quest'aumento di volume. Appare evidente come ciò avvenga sia nelle arterie, che portano il sangue ossigenato dal cuore, sia nelle vene, dove scorre il sangue non ossigenato.

A questo punto sembra abbastanza chiaro come esista una forte correlazione tra l'emodinamica, termine con cui si descrive il flusso e il volume del sangue, e il funzionamento dell'encefalo. Gli effetti descritti fin ora trovano riscontro nelle tecniche d'imaging funzionale che utilizzano la risonanza magnetica nucleare (fMRIfunctionalMagneticResonanceImaging) e analizzano l'attivazione cerebrale in relazione allo studio dell'effetto BOLD: BloodOxygenLevelDependent (dipendente dal livello d'ossigenazione del sangue).

## **5.2 Tecnica BOLD**

L'effetto BOLD fu scoperto nei laboratori ATT Bell nel 1990 da Seiji Ogawa. Due anni dopo la sua scoperta, fu utilizzato per la prima volta nello studio del cervello umano e da allora, è la tecnica più frequentemente utilizzata dal momento che ha trasformato la neurologia odierna. Successivamente fu scoperto che le variazioni nell'attività cerebrale di un soggetto creano uno sbilanciamento tra la sottrazione d'ossigeno ed il flusso sanguigno. Quindi si può affermare che uno stimolo sensoriale, motorio o cognitivo produce un aumento localizzato dell'attività neurale. Ciò

produce una locale vasodilatazione che genera, a sua volta, un rapido aumento del volume sanguigno causato dalla produzione di metaboliti aventi proprietà vasodilatatorie o, più probabilmente, da un effetto diretto sui vasi sanguigni locali. La causa di tale fenomeno non è nota con chiarezza, ma potrebbe coinvolgere il rilascio dipendente dall'attività di fattori chimici quali l'ossido nitrico, l'adenosina, gli ioni idrogeno o potassio, o potrebbe coinvolgere una stimolazione nervosa diretta della muscolatura vascolare.

Qualunque sia il meccanismo, il cambiamento nel flusso sanguigno e conseguentemente, dell'apporto d'ossigeno, è circa 2-4 volte maggiore del corrispondente aumento del volume sanguigno. Un eccesso d'emoglobina ossigenata viene inviato alle regioni attivate riducendo in tal modo la quantità di deossiemoglobina all'interno della porzione del tessuto cerebrale analizzato.

### **5.3 Confronto NIRs e BOLD-fMRI**

Per il momento la più avanzata tecnica d'imaging cerebrale è la risonanza magnetica funzionale (fMRI), ma possiede serie limitazioni. Come descritto precedentemente la tecnica BOLD permette di misurare il deflusso della deoxy-emoglobina, però bisogna evidenziare che il segnale BOLD risulta dipendere non solo dalle variazioni di concentrazioni dell'emoglobina deossidata ma anche dalle variazioni nel volume totale di sangue. Infatti, le cause principali di un aumento nel segnale BOLD sono le seguenti:

1. decremento della concentrazione di deoxy-emoglobina causato da un incremento del flusso d'ingresso di nuovo sangue ossigenato;
2. incremento della porzione d'acqua intravascolare dovuto ad un incremento del volume totale di sangue;
3. incremento d'entrambe le quantità intravascolari d'emoglobina deossigenata e volume sanguigno ma quest'ultimo di una quantità superiore.

In campo medico sono stati effettuati diversi esperimenti e hanno portato alla conclusione che la sola fMRI non è sufficiente a fornire un quadro completo per la descrizione della fisiologia cerebrale. Per aggirare quest'inconveniente sono state eseguite misure simultanee, sia con fMRI che con strumentazioni NIRs (figura 1, 5.3).

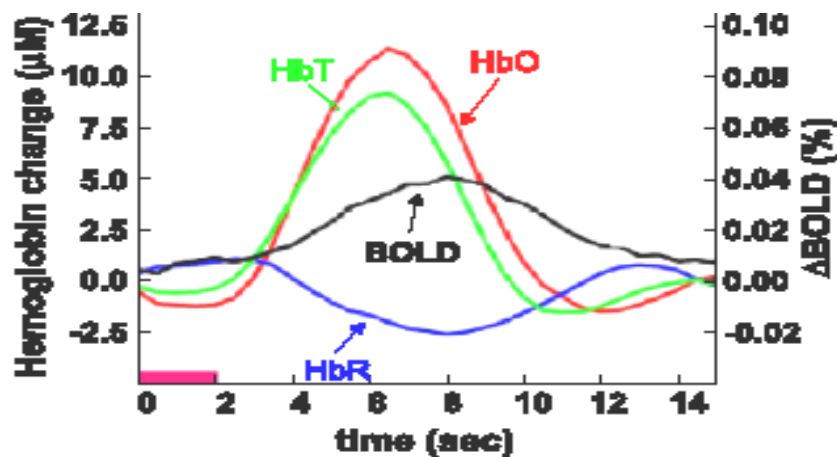


Figura 1 (emoglobina ossidata e deossidata in relazione all'effetto BOLD)

Da queste misure si è scoperto uno stretto legame tra le due tecniche. È importante sottolineare la similitudine tra la variazione nel segnale BOLD e le variazioni della concentrazione d'emoglobina deossidata. Grazie ai lavori di misura simultanea, la tecnica NIRs ha acquisito sempre maggiore importanza in campo medico, consentendo, soprattutto, una migliore risoluzione temporale rispetto alla fMRI.

#### 5.4 Emodinamica cerebrale

Cerchiamo a questo punto di dimostrare la capacità della tecnica NIRs, di leggere le variazioni d'emoglobina indotte da uno stimolo esterno, ossia il così detto segnale emodinamico lento. Infatti, bisogna fare attenzione nel distinguere due tipi fondamentali di segnale presenti nel cervello e dovuti entrambi allo stesso stimolo, ma con caratteristiche differenti.

Segnale veloce: è caratterizzato da una risposta temporale dell'ordine del millesimo di secondo ed è collegato direttamente all'attività elettrica del neurone, che produce piccole variazioni nelle proprietà ottiche del neurone, probabilmente nello scattering delle membrane neuronali.

Segnale emodinamico lento: questa tipologia di segnale è caratterizzata da una risposta temporale dell'ordine dei secondi e può essere attribuita alle variazioni nell'assorbimento che sono principalmente prodotte dalle variazioni emodinamiche e di ossigenazione dovute all'accoppiamento neurovascolare relativo all'attività neurale di una determinata area cerebrale. In breve, l'attivazione neuronale incrementa il consumo d'ossigeno, il quale subito dopo porta ad un aumento del flusso di sangue che influisce sulle concentrazioni di ossiemoglobina e deossiemoglobina.

#### **5.4.1 Segnale emodinamico lento**

Esistono diversi tipi di attività cerebrale come, attivazioni motorie, attivazioni visuali, o stimolazioni sensoriali di vario genere; complessivamente si può affermare che la risposta cerebrale è caratterizzata, anche se in diverse zone o in diverse quantità, dalle seguenti variazioni:

- a causa di un'attivazione cerebrale si avrà un incremento locale del flusso di sangue che sarà superiore dell'effettivo consumo di ossigeno;
- durante un'attivazione la pressione parziale di ossigeno cresce lentamente fino a raggiungere, dopo circa 20s, un valore di saturazione per poi decadere, in modo simile, dopo la fine della stimolazione;
- le variazioni regionali del volume di sangue rimangono molto localizzate rispetto alle variazioni regionali delle concentrazioni di Hb;
- l'aumento del flusso determina un incremento sia della velocità del sangue che del volume sanguigno;

- L'aumento della velocità risulta meno evidente nei tessuti in cui è presente l'attivazione in modo da permettere ai tessuti di ossigenarsi;
- L'aumento dell'attività neurale causa un aumento rispetto i valori di base-line delle concentrazioni d'emoglobina totale e ossigenata e un decremento dell'emoglobina deossigenata.

#### 5.4.2 Interferenze biologiche

Numerosi eventi naturali influiscono sull'emodinamica dei tessuti. Le variazioni sistematiche del volume e del flusso nei compartimenti arteriali sono causate dalle contrazioni pulsatili del battito cardiaco. La respirazione spontanea produce variazioni periodiche del torace.

Queste azioni modulano sia la pressione venosa di ritorno che, anche se in modo più lieve, la pressione arteriosa. Un esempio di artefatti biologici presenti nel segnale emodinamico può essere visto nella figura seguente (figura 2, 5.4.2).

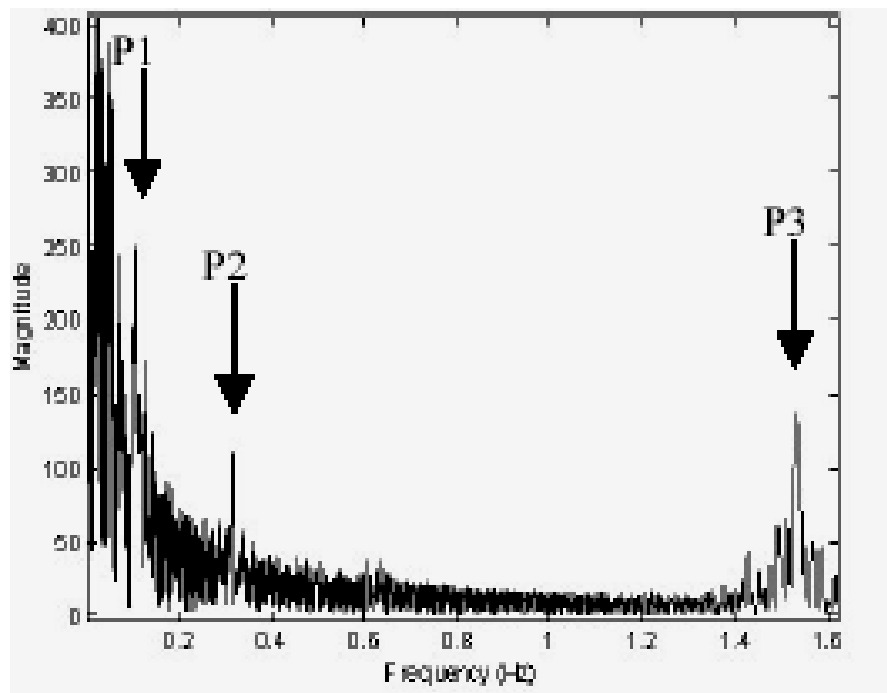


Figura 2 (P1 onda di Mayer 0.1Hz, P2 rumore polmonare 0.2-0.4Hz, P3 battito cardiaco)

L'ampiezza di queste modulazioni varia solitamente con la lunghezza d'onda della sorgente utilizzata. Per esempio, una sorgente di 690nm, risente maggiormente di una componente polmonare la cui frequenza è molto più vicina al segnale emodinamico rispetto a quella cardiaca. La modulazione polmonare è più larga in ampiezza ma con una frequenza inferiore al battito cardiaco. Il risultato è che può causare interferenze al segnale emodinamico.

## **5.5 Proprietà ottiche dei tessuti**

La propagazione della luce nei tessuti biologici è caratterizzata da diversi fenomeni fisici tra i quali i più importanti sono l'assorbimento e lo scattering; entrambi dipendenti dalla lunghezza d'onda, ma il meccanismo dominante è quello dello scattering. Infatti, per spessori sotto il millimetro, i fotoni iniettati subiscono più volte lo scattering prima di raggiungere il bordo; come conseguenza anche un fascio di luce coerente, si presenta incoerente e isotropo dopo aver attraversato pochi millimetri di tessuto. E' importante come lo studio di questi fenomeni permetta di ricavare le variazioni di particolari cromofori nel tempo, consentendo una valutazione fisiologica del tessuto sotto indagine.

### **5.5.1 Assorbimento**

E' possibile descrivere il fenomeno dell'assorbimento in un mezzo non scatterizzante tramite la relazione tra la variazione d'intensità luminosa e le proprietà ottiche e fisiche del campione:  $\Delta I = -\mu_a I \Delta x$ , dove  $\Delta I$  è la variazione differenziale dell'intensità luminosa e  $I$  è l'intensità del fascio di luce che attraversa una porzione  $\Delta x$  di un mezzo omogeneo con coefficiente di assorbimento  $\mu_a$ .

Integrando il coefficiente di assorbimento con uno spessore  $x$  si ottiene:

$$I=I_0\exp(-\mu_a x).$$

Il coefficiente d'assorbimento può anche essere espresso in termini di densità della particella  $\rho$  e di superficie d'assorbimento  $\sigma_a$ :  $\mu_a = \rho \sigma_a$ . Sostituendo l'ultima espressione di  $\mu_a$ , la relazione tra luce incidente e luce rivelata che esprime la legge di Lambert-Beer, si ottiene:

$$I = I_0 \exp(-\rho \sigma_a x)$$

Il reciproco del coefficiente d'assorbimento,  $1/\mu_a$  è chiamato anche lunghezza del percorso di assorbimento e rappresenta il cammino libero medio percorso da un fotone tra due fenomeni consecutivi di assorbimento. Un'altra quantità che viene comunemente usata è il coefficiente specifico di estinzione  $\alpha$ , che rappresenta il livello di assorbimento per  $\mu\text{moli}$  di composto per litro di soluzione per centimetro; il legame con il coefficiente di assorbimento è dato dalla seguente relazione:  $\alpha = \log_{10}(e) \mu_a C^{-1}$ , dove  $C$  è la concentrazione del composto.

Possiamo a questo punto introdurre  $T$ , il coefficiente di trasmissione, come il rapporto tra la luce trasmessa e quella incidente:

$$T = I / I_0$$

Tramite il coefficiente  $T$  possiamo introdurre la densità ottica del mezzo OD:

$$OD = \log_{10}(1/T) = \log_{10}(I/I_0)$$

e quindi sostituendo l'espressione del coefficiente di assorbimento si ottiene in definitiva una relazione che lega la densità ottica con la concentrazione in moli della sostanza di interesse:

$$OD = \log_{10}(e) \mu_a x = \alpha C x$$

### 5.5.2 Assorbimento dei componenti del tessuto biologico

Lo scopo di questa sezione è fornire le caratteristiche d'assorbimento all'interno del NIR dei principali cromofori presenti nei tessuti biologici. In particolare il nostro interesse è rivolto



verso quelle sostanze che si trovano in concentrazioni ragionevoli e quelle che hanno caratteristiche d'assorbimento dipendenti dalla quantità d'ossigeno presente.

Dalla letteratura è possibile considerare come sostanze principali nel fenomeno dell'assorbimento le seguenti:

- Acqua
- Grassi(lipidi)
- Emoglobina

E' interessante rilevare che le concentrazioni dei primi due rimangono ragionevolmente costanti su piccole scale temporali, mentre l'emoglobina risulta variare secondo il metabolismo e la funzione del particolare tessuto.

### 5.5.2.1 Acqua

Nella figura che segue è riportato lo spettro d'assorbimento dell'acqua nell'intervallo tra i 600-1000 nm. E' evidente che l'assorbimento effettivo dovuto alla presenza d'acqua è relativamente basso e pressoché costante fino ai 900 nm ma bisogna tenere in considerazione l'elevata percentuale in peso di questa sostanza che, nei tessuti considerati, può anche superare l'80% (figura 3, 5.5.2.1).

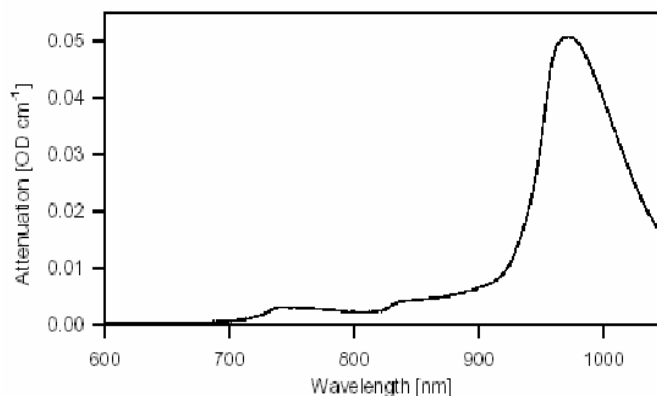


Figura 3 (spettro di assorbimento dell'H2O)

### 5.5.2.2 Grassi

I lipidi costituiscono circa il 5% in peso del cervello di un uomo, dove possono raggiungere anche il 17% dei componenti la materia bianca cerebrale. La figura seguente mostra il coefficiente di estinzione in funzione della lunghezza d'onda dei lipidi presenti nel tessuto muscolare; si nota che anche in questo caso l'assorbimento rimane costante per un certo intervallo all'interno del NIR (figura 4, 5.5.2.2).

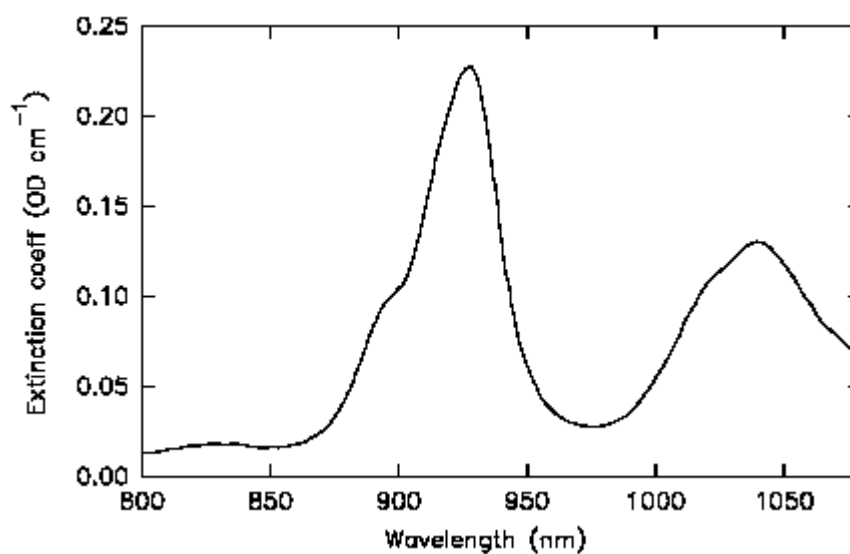


Figura 4 (spettro di assorbimento dei lipidi)

### 5.5.2.3 Emoglobina

La figura che segue, rappresenta lo spettro d'assorbimento della sostanza nelle sue due forme più comuni, emoglobina ossidata (HbO<sub>2</sub>) e deossidata(Hb); è importante notare la differenza in ampiezza tra il coefficiente d'estinzione nel visibile e nella parte NIR dello spettro (figura 5, 5a,5b, 5.2.3).

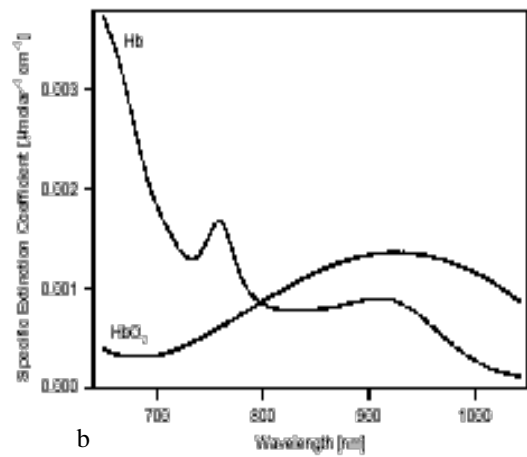
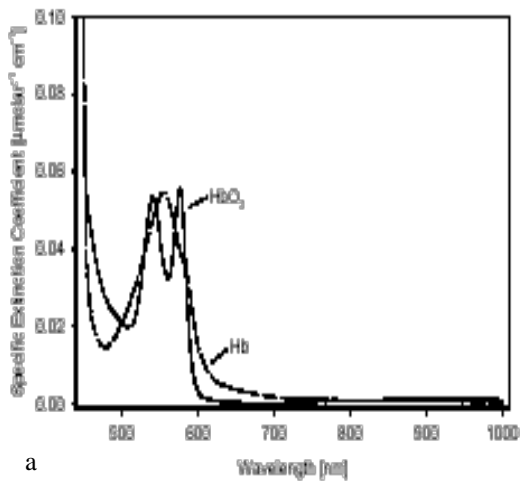


Figura 5a (spettri di assorbimento di Hb nel visibile). Figura 5b (spettro di assorbimento di Hb nel non visibile)

Un'altra importante caratteristica che emerge nel secondo grafico è detta "punto isobestico", dove il coefficiente di estinzione delle due forme di emoglobina è lo stesso. Dall'osservazione dello stesso grafico si può anche notare che la forma non ossidata dell'emoglobina ha dei picchi d'assorbimento intorno ai 690nm: è questa la ragione per cui il sangue venoso ha un rosso più scuro rispetto a quello arterioso.

Nella figura che segue è riportata la curva di dissociazione dell'emoglobina ossigenata, che mette in relazione la saturazione d'emoglobina ( $SO_2$ ) espressa in percentuale, con la pressione parziale dell'ossigeno dissolto nel sangue ( $PO_2$ ):

$$SO_2 = \frac{[HbO_2]}{[Hb] + [HbO_2]} \text{ (figura 6, 5.5.2.3)}$$

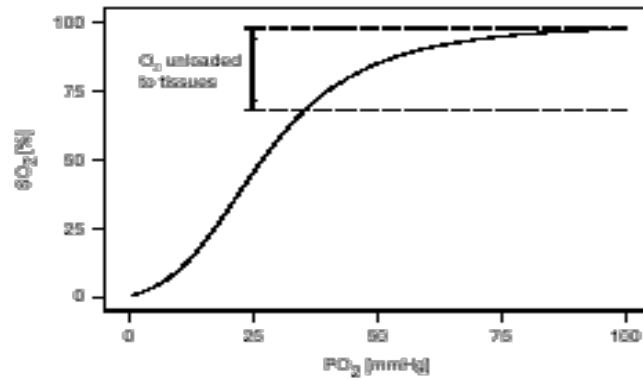


Figura 6 (relazione tra emoglobina saturata e pressione di ossigeno nel sangue)

Si può osservare come il sangue che lascia il polmone è saturo d'ossigeno intorno al 97%, mentre il sangue venoso presenta una saturazione intorno al 67%; quindi approssimativamente il 30% dell'emoglobina ossigenata cede l'ossigeno che trasporta ai tessuti durante un ciclo attraverso il corpo.

Dal calcolo dei coefficienti d'assorbimento del tessuto è possibile determinare sia il volume del sangue che l'ossigenazione; l'incremento dell'assorbimento intorno ai 600nm pone un limite inferiore per misure di spettroscopia e di formazione dell'immagine.

Nella figura seguente sono riportati alcuni dati riguardanti altri tipi di tessuti; si può notare quanto lo scattering sia più basso nel cervello del neonato rispetto all'adulto e quanto siano piccole le differenze tra materia grigia e materia bianca (figura 7, 5.5.2.3).

Tissue type	Sample	$\lambda$ [nm]	$\mu_a$ [mm <sup>-1</sup> ]	$\mu_s'$ [mm <sup>-1</sup> ]
neonatal grey matter	in vitro	650-900	0.04-0.08	0.4-0.9
neonatal white matter	in vitro	650-900	0.04-0.07	0.5-1.2
adult brain	in vitro	700-900	0.1-0.2	2-5
adult grey matter	in vivo	811	0.018-0.019	0.48-0.74
adult grey matter	in vivo	849	0.018-0.019	0.45-0.74
adult white matter	in vivo	849	0.013	0.98
adult skull	in vivo	849	0.022	0.91
adult grey matter	in vitro	650-900	0.04-0.06	1.9-2.2
adult white matter	in vitro	650-900	0.02-0.03	8-10
pig brain	in vitro	630	0.026	5.7
pig skull	in vitro	650-950	0.04-0.05	2.63-1.32
healthy breast tissue	in vitro	700-900	0.022-0.075	0.53-1.42
breast carcinoma	in vitro	700-900	0.045-0.050	0.89-1.18
healthy breast tissue	in vivo	800	0.002-0.003	0.72-1.22

Figura 7 (esempio di spettro di assorbimento di alcuni tessuti fisiologici)

### 5.5.3 Scattering

Il campo elettromagnetico della radiazione incidente è in grado di far oscillare la nube elettronica, dalla vibrazione della nube elettronica viene creato un dipolo oscillante e la luce viene diffusa in tutte le direzioni sia alla stessa frequenza della luce incidente sia a frequenze diverse.

L'atomo o la molecola, non avendo sufficiente energia per la transizione atomica, continua a rimanere nel suo stato fondamentale. L'effetto dello scattering è sostanzialmente quello di aumentare la lunghezza del percorso che i fotoni compiono all'interno del tessuto; un effetto, se vogliamo indiretto, dovuto alla dispersione dei fotoni, è quello che riguarda l'aumento della probabilità di un evento d'assorbimento, quindi in un mezzo ad elevato scattering è maggiore anche l'assorbimento che è ad esso collegato. Come abbiamo già potuto accennare lo scattering è il fenomeno dominante alle lunghezze d'onda del vicino infrarosso (NIR), da 600nm a 900nm, che sono quelle di nostro interesse.

Esistono tre tipi di scattering : elastico , quasi elastico ed anelastico. Nel caso di scattering elastico, o di Rayleigh, la luce incidente viene diffusa elasticamente, senza assorbimento di energia e quindi senza spostamento in frequenza della luce diffusa. Il fotone interagisce con una molecola che si trova nel suo stato fondamentale, ma l'energia in gioco non è sufficiente per una transizione

ad alcun livello stabile. Le condizioni instabili corrispondono ai livelli eccitati e possono essere uno stato elettronico, rotazionale, vibrazionale o di spin. Quando l'onda incidente ha energia pari alla differenza di energia fra un livello finale eccitato e lo stato iniziale, l'atomo va in risonanza. Lo scattering anelastico avviene, invece, con assorbimento d'energia e la luce viene diffusa sia a frequenze più alte (Stokes) sia più basse (antiStokes) della banda di Rayleigh centrale. Nello scattering quasi elastico l'onda scatterizzata presenta due componenti una non spostata in frequenza mentre un'altra ha uno shift frequenziale rispetto a quella incidente. Questa componente è dovuta ai moti diffusivi, sia traslazionali che rotazionali, delle molecole quando queste hanno dimensioni molto minori della lunghezza d'onda della radiazione incidente.

Utilizzando il modello di propagazione dell'onda elettromagnetica, le caratteristiche diffusive dei tessuti sono correlate alla loro morfologia, alle variazioni spaziali della densità e all'indice di rifrazione. Un mezzo diffusivo viene di solito schematizzato come una matrice di particelle scatterizzanti distribuite casualmente con indice di rifrazione differente dal mezzo circostante. Sia la disposizione spaziale, sia la configurazione delle cellule e delle macromolecole, influenzano le proprietà diffusive. I coefficienti dipendono, inoltre, in modo inversamente proporzionale dalla lunghezza d'onda. L'effetto dello scattering è sostanzialmente quello di aumentare la lunghezza del percorso che i fotoni compiono all'interno del tessuto; un effetto, se vogliamo indiretto dovuto alla dispersione dei fotoni, è quello che riguarda l'aumento della probabilità di un evento d'assorbimento, quindi in un mezzo ad elevato scattering è maggiore anche l'assorbimento che è ad esso collegato.

Quando la radiazione NIR entra nel tessuto e subisce lo scattering, teoricamente tutte le collisioni che si verificano sono elastiche e la direzione che il fotone scatterizzato assume, dipende dalla lunghezza d'onda della luce, dalla sezione di scattering della particella e dagli indici di rifrazione dei mezzi che il fotone sta attraversando. L'attenuazione dovuta al singolo effetto di scattering sarà proporzionale ai seguenti fattori:

la densità delle particelle che possono subire lo scattering (N);

la lunghezza del percorso ottico delle particelle (d);

la sezione trasversale di scattering delle particelle (s).

Possiamo quindi scrivere che l'attenuazione A sarà:  $A = N \cdot s \cdot d$ . Il prodotto  $N \cdot s$  è conosciuto come coefficiente di scattering del mezzo  $\mu_s$ , e per quanto riguarda i tessuti umani generalmente  $\mu_s$  è compreso nell'intervallo che va dai 10 ai 100  $\text{mm}^{-1}$ .

A causa dello scattering, dopo che la luce è penetrata per pochi millimetri nel tessuto, viene a mancare l'originaria collimazione del fascio luminoso che può essere trattato come se fosse distribuito in maniera isotropa.

Per tenere in considerazione la presenza di una diffusione anisotropa bisogna inserire il fattore d'anisotropia g (fattore di Landé) per descrivere la distribuzione angolare della luce scatterizzata. Il fattore g appartiene all'intervallo  $[-1,1]$  ed è matematicamente definito come il valor medio del coseno dell'angolo di scattering:

$$g = \int_{-1}^1 \cos\theta * f(\cos\theta) d \cos\theta$$

Nella formula,  $f(\cos\theta)$  rappresenta la funzione di distribuzione di probabilità degli eventi di scattering in funzione dell'angolo di diffusione. Detto, infatti,  $e_s$  il vettore che descrive il cammino di un fotone, la probabilità che il fotone venga diffuso in una direzione  $e_s'$  è data dalla funzione di fase  $f(e_s, e_s')$ ; per convenienza esprimiamo la distribuzione di probabilità in funzione del prodotto  $e_s * e_s'$  che è pari proprio al  $\cos\theta$ .

I casi limite per questo fattore sono  $g=0$  nel caso di scattering isotropico e  $g=1$  per lo scattering completamente anisotropico. Normalmente per i tessuti biologici varia tra 0,65 e 0,95.

Questo fattore viene considerato definendo il coefficiente di trasporto, parametro fondamentale nella teoria della diffusione:  $\mu_s' = \mu_s (1-g)$ , il quale rappresenta il numero di eventi di scattering isotropo per unità di lunghezza. Anche per quanto riguarda lo scattering, come già sopra per l'assorbimento, possiamo scrivere che:

$$I = I_0 \exp(-\mu_s x),$$

dove I rappresenta la componente non scatterizzata della luce, dopo che quest' ultima ha

attraversato un campione di tessuto di spessore  $x$ , che non la assorbe.

Il coefficiente di scattering rappresenta la probabilità per unità di lunghezza che un fotone subisca un evento di dispersione, il reciproco o lunghezza di percorso di scattering  $1/\mu_s$  è il cammino libero medio percorso dal fotone tra due eventi di scattering successivi. I tessuti che maggiormente risentono di quest'effetto sono le ossa, la materia bianca cerebrale e il derma della pelle.

Combinando il coefficiente di scattering e quello d'assorbimento si può definire il coefficiente d'attenuazione totale:  $\mu_t = \mu_s + \mu_a$ , dove  $1/\mu_t$  rappresenta il cammino libero medio tra due eventi di assorbimento o di scattering.

## 5.6 Propagazione della luce in un mezzo omogeneo

L'interazione radiazione materia deve essere necessariamente trattata considerando i fenomeni di scattering e assorbimento e trascurando i fattori che hanno minor incidenza. Un fascio collimato di luce di breve durata incidente su un mezzo altamente diffusivo viene disperso e scatterizzato in poco tempo; l'assorbimento ha minore rilievo rispetto allo scattering (figura 8, 5.5).

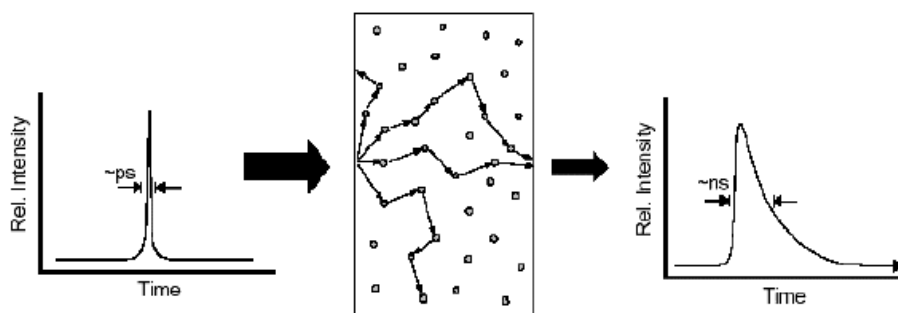


Figura 8 (esempio di assorbimento e scattering su un mezzo altamente diffusivo)

È necessario ora trovare dei modelli matematici che descrivano questa interazione. Dato il dualismo onda corpuscolo esistono due approcci differenti per descrivere la propagazione della luce attraverso un mezzo non omogeneo: teoria analitica e teoria del trasporto per radiazione.



### 5.6.1 Teoria analitica

La propagazione della luce viene trattata con le equazioni di Maxwell e con vari metodi numerici. Il suo principale inconveniente è dato dalla complessità matematica.

### 5.6.2 Teoria del trasporto

Se si considera la luce come un flusso di particelle, fotoni, aventi energia quantizzata, si ignorano i fenomeni ondulatori di polarizzazione e interferenza e le proprietà delle particelle, come le collisioni inelastiche, il trasporto di energia attraverso un mezzo non omogeneo può essere descritto, statisticamente, mediante l'equazione di trasporto per radiazione:

$$\frac{1}{c} \frac{\partial I(r,t,es)}{\partial t} + es \cdot \nabla I(r,t,es) + (\mu_a + \mu_s) I(r,t,es) = \mu_s \int_{4\pi} f(es,es') I(r,t,es) d^2 es + q(r,t,es)$$

dove,  $c$  è la velocità della luce,  $\mu_a$  coefficiente di assorbimento,  $\mu_s$  coefficiente di scattering,  $f(es,es')$  funzione di fase,  $q(r,t, es)$  sorgente della radiazione,  $I(r,t, es)$  rappresenta il trasferimento di energia per unità di tempo e unità di angolo solido  $d^2e_s$ , che attraversa un'area unitaria posta in  $r$  al tempo  $t$ .

Integrando  $I(r,t, es)$  sull'angolo solido si ottiene il flusso attraverso un'area unitaria; l'equazione deriva da un bilancio energetico su un volume elementare di tessuto e mette in relazione la variazione temporale dell'intensità  $I(r,t, es)$  con la variazione del flusso di energia, le perdite dovute ad assorbimento e scattering e i termini di generazione dovuti a sorgenti interne di radiazione e scattering. Affinché questa equazione sia valida bisogna assumere che il tessuto sia una matrice omogenea contenente centri distribuiti casualmente di assorbimento e scattering descritti

dai due parametri  $\mu_a$ ,  $\mu_s$  e dal fattore di anisotropia di scattering  $g$ . Sfortunatamente non esiste alcuna soluzione analitica generale per gli studi sull'interazione sorgente - tessuti ma soltanto delle soluzioni approssimate.

Un'approssimazione utilizzata è data dall'equazione di diffusione che presuppone che la probabilità di scattering sia maggiore di quella d'assorbimento:

$$\frac{1}{c} \frac{\partial \Phi(r,t)}{\partial t} - \nabla \kappa(r) \nabla \Phi(r,t) + \mu_a(r) \Phi(r,t) = q_0(r,t)$$

dove  $\Phi$  rappresenta la densità di fotoni:

$$\Phi(r,t) = \int_{4\pi} I(r,t, \mathbf{e}_s) d^2\mathbf{e}_s,$$

$\kappa$  è il coefficiente di diffusione definito come:

$$\kappa(r) = 1 / [3(\mu_a + \mu_s')],$$

dove  $\mu_s'$  è il coefficiente di scattering ridotto pari a  $\mu_s (1-g)$ ; infine  $q_0$  rappresenta una sorgente isotropa.

## 5.7 Effetto dello scattering

Se consideriamo un mezzo che assorbe la luce ma non presenta lo scattering allora sappiamo, per quanto esposto precedentemente, che possiamo applicare la legge di Lambert-Beer, ed in questo caso l'attenuazione è data da:  $A = \mu_a l$ , con  $\mu_a$  (coefficiente di assorbimento) e  $l$  (distanza di propagazione della luce nel mezzo); misurando  $A$  e conoscendo  $l$  si può determinare facilmente il coefficiente di assorbimento, il quale a sua volta è proporzionale alla concentrazione  $C$  del cromoforo che assorbe la luce.

Quando il mezzo presenta anche lo scattering oltre all'assorbimento, allora l'attenuazione  $A$  si modifica secondo i seguenti punti:

- $A$  deve includere anche un fattore  $g$  che tiene conto delle perdite dovute allo scattering.

-Lo scattering fa sì che la lunghezza del percorso affrontato dai fotoni, che chiameremo appunto percorso differenziale (DP - Differential pathlength), sia considerevolmente più grande rispetto alla distanza geometrica  $l$  tra sorgente e ricevitore; questa quantità è fortemente dipendente dal coefficiente di scattering modificato  $\mu_s'$  ( $\mu_s' = \mu_s (1-g)$ ) con fattore  $g$  che tiene conto dell'anisotropia del tessuto).

Il DP è funzione anche del coefficiente d'assorbimento  $\mu_a$ , questo è osservato sperimentalmente che predetto teoricamente dalla teoria della diffusione. Quanto illustrato nei punti precedenti implica che l'attenuazione  $A$  sia in questo caso una funzione non lineare del coefficiente di assorbimento  $\mu_a$  secondo la relazione:

$$A = \sum_1^N \varepsilon_i [C_i] B d + G$$

Quindi la relazione lineare che metteva in relazione il coefficiente di assorbimento e l'attenuazione subita dalla luce che attraversa il tessuto, si è trasformata in una funzione non lineare; si può osservare come nel caso di assenza di scattering la pendenza della curva (una retta) rappresenti proprio la distanza  $l$  geometrica a cui sono posti emettitore e ricevitore, mentre se si considera anche l'effetto dello scattering allora la pendenza della curva è uguale al DP.

L'aver considerato lo scattering introduce delle complicazioni nel momento in cui si cerca di determinare la concentrazione di un cromoforo utilizzando solo misure d'attenuazione:

l'attenuazione totale  $A$  che si misura non può restituire direttamente il valore di  $\mu_a$ , visto che contiene anche un contributo  $G$  dovuto alle perdite per scattering che non è conosciuto; tuttavia rimane la possibilità di determinare le variazioni di concentrazione dei cromofori in esame assumendo che  $G$  rimanga costante durante la misura; in questo modo è infatti possibile determinare il vero valore del coefficiente di assorbimento e da questo determinare la variazione di concentrazione.

Generalmente per determinare le variazioni di concentrazione è necessario conoscere il DP

che dai dati presenti in letteratura si dimostra essere superiore a  $l$  di un fattore compreso fra tre e sei.

Generalmente si assume che il DP sia approssimativamente costante in modo da poterlo utilizzare come distanza di separazione tra emettitore e ricevitore nella legge di Lambert-Beer modificata.

### 5.7.1 Inserimento del fattore di scattering sulla legge di Lambert – Beer

L'equazione di Lambert-Beer modificata fornisce una descrizione empirica dell'attenuazione ottica in un mezzo essenzialmente scatterizzante:  $I = I_0 e^{-\alpha C l \text{ DPF} + G}$ , dove  $I_0$  rappresenta l'intensità della luce incidente,  $I$  l'intensità della luce rilevata,  $\alpha$  il coefficiente di estinzione molare del mezzo,  $l$  la distanza fra sorgente e rivelatore,  $C$  la concentrazione del mezzo, DPF il fattore differenziale del percorso,  $G$  la costante di attenuazione che tiene conto delle proprietà ottiche e geometriche dei tessuti.

Per mettere meglio in evidenza la concentrazione, l'equazione può anche essere scritta in forma logaritmica:  $OD = \log_{10}(I/I_0) = -\alpha C l \text{ DPF} + G$ , dove OD rappresenta la densità ottica. Una variazione di concentrazione della sostanza assorbente fa sì che l'intensità rilevata aumenti o diminuisca. Quando varia la concentrazione, il coefficiente di estinzione e la distanza sorgente rivelatore rimangono costanti; inoltre si assume che anche il DPF e  $G$  rimangano costanti. Il fattore differenziale di percorso, va a moltiplicare nell'equazione la distanza tra la sorgente e il rivelatore proprio perché, a causa dello scattering, la distanza percorsa da ciascun fotone è maggiore di  $l$ . Il prodotto  $\text{DPF} \cdot l$  viene definito percorso differenziale. La costante  $G$  non è nota per cui l'equazione precedente non può fornire il valore assoluto della concentrazione del mezzo  $C$ ; se vogliamo eliminare questa incognita possiamo ricorrere ad una misura differenziale: assumendo costanti  $l$ , DPF e  $G$ , è possibile calcolare la variazione di concentrazione:

$$\Delta OD = \log_{10}(I_{\text{finale}}/I_{\text{iniziale}}) = -\alpha \Delta C l \text{ DPF},$$

dove  $\Delta C = C_{\text{finale}} - C_{\text{iniziale}}$ , OD densità ottica,  $\Delta OD = OD_{\text{finale}} - OD_{\text{iniziale}}$ .

I valori sono funzione della frequenza e dei cromofori indagati: infatti,  $\Delta OD(\lambda)$  rappresenta la variazione di densità ottica misurata ad una data lunghezza d'onda,  $\Delta\mu_a(\lambda)$  è la corrispondente variazione di assorbimento del mezzo e  $DPF(\lambda)$  il fattore differenziale del percorso mediante il quale teniamo conto del cammino aumentato dei fotoni dovuto a scattering e assorbimento.

La relazione per ossiemoglobina e deossiemoglobina può quindi essere espressa nella seguente forma:

$$\Delta OD(\lambda) = \Delta\mu_a(\lambda) * l * DPF(\lambda) = [\alpha_{HbO_2}(\lambda)\Delta[HbO_2] + \alpha_{Hb}(\lambda)\Delta[Hb]] * l * DPF(\lambda),$$

dove la variazione di concentrazione dei cromofori è funzione delle variazioni di assorbimento tramite i coefficienti di estinzione che dipendono dalla frequenza.

### 5.8 Fattore differenziale di lunghezza del percorso

Nei precedenti paragrafi si messo in evidenza una relazione che lega le variazioni di attenuazione alle variazioni delle proprietà ottiche in esame:

$$\Delta A = \frac{\partial A}{\partial \mu_a} \Delta \mu_a + \frac{\partial A}{\partial \mu'_s} \Delta \mu'_s$$

Assumendo che durante il periodo di misura le variazioni dovute allo scattering possono essere trascurate, la variazione in attenuazione diventa:

$$\Delta A = \frac{\partial A}{\partial \mu_a} \Delta \mu_a = \frac{\partial A}{\partial \mu_a} \varepsilon \Delta c$$

Nella figura che segue viene plottata l'attenuazione, calcolata usando una soluzione dell'equazione di diffusione, rispetto l'assorbimento per un valore di scattering fisso (figura 9, 5.8).

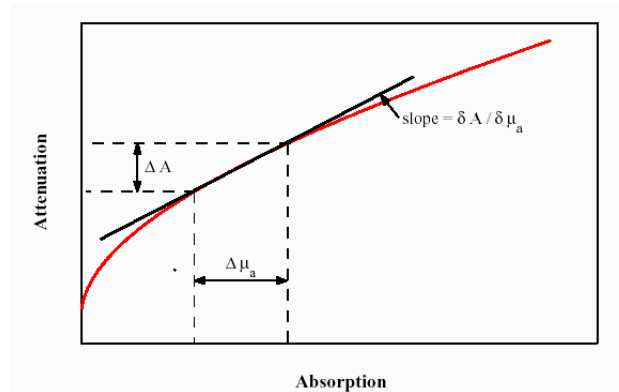


Figura 9 (attenuazione dell'assorbimento rispetto un valore di scattering fisso)

La tangente alla curva, matematicamente la derivata parziale dell'attenuazione rispetto all'assorbimento, rappresenta il cammino ottico medio compiuto dalla luce nell'attraversare il mezzo dalla sorgente al rivelatore, noto come differenziale di lunghezza di percorso:

$$DP = \frac{\partial A}{\partial \mu_a}$$

Il fattore differenziale del percorso, che può essere calcolato con vari metodi, dipende da:

-coefficiente di assorbimento e scattering. Essendo i due valori funzione della frequenza, anche il fattore differenziale del percorso dipende implicitamente da essa. Da misure sperimentali nell'intervallo di frequenze compreso tra i 690 nm e gli 840 nm si è stimata una diminuzione del 12% del valore del DPF all'aumentare della lunghezza d'onda. Per questo motivo è sempre importante, qualora si voglia misurare il DPF, conoscere la lunghezza d'onda alla quale effettuare la misura.

-Tipo di tessuto indagato. Il DPF dipende in maniera diretta dalla percentuale di tessuto molle, di muscolo e di ossa presenti nel tessuto illuminato dalla luce infrarossa. Recentemente sono stati condotti studi sulla dipendenza del DPF dall'anzianità del soggetto in esame: i risultati mostrano una lenta variazione del DPF con l'età che può così esplicitata:

$$DPF_{780} = 5.13 + 0.07 \cdot Y^{0.81},$$

dove  $DPF_{780}$  rappresenta il fattore differenziale di percorso alla lunghezza d'onda di 780nm e  $Y$  è

l'età del soggetto misurata in anni.

Misure del DPF sulla testa, sul polpaccio e sull'avambraccio di adulti e sulla testa di neonati, hanno dato risultati differenti.

-Disposizione geometrica di emettitore e ricevitore. Si può dimostrare con l'aiuto di una simulazione su personal computer che il DPF dipende dalla posizione reciproca di emettitore e ricevitore. Se l'angolo individuato da emettitore e rivelatore è compreso tra i 60 e i 180 gradi, il DPF varia significativamente e la variazione è ancora maggiore per angoli minori.

Sperimentalmente, invece, si osserva che in tutti i tessuti il DPF inizialmente decresce con l'aumento della distanza geometrica  $d$  tra sorgente e ricevitore, per mantenere poi un valore pressoché costante quando  $d$  supera i 2.5 centimetri.

L'incongruenza tra i risultati teorici forniti dalla simulazione e quelli sperimentali può essere in parte spiegata dal fatto che nel modello teorico utilizzato al computer non vengono considerate le disomogeneità presenti nel tessuto sotto indagine. Se modellassi il tessuto come un sistema multistrato, formato da più strati adiacenti ciascuno con caratteristiche proprie, allora i risultati teorici e sperimentali coinciderebbero.

## **5.9 Metodi per la determinazione del DPF**

In questa tecnica di spettroscopia assume particolare importanza la determinazione corretta del DPF, per questo motivo sono stati sviluppati diversi metodi di calcolo:

-Metodi basati sul calcolo del tempo di volo: misura la differenza temporale  $\langle t \rangle$ , tra il tempo medio impiegato dalla luce per attraversare una distanza  $d$  tra fibra trasmittente e ricevente e l'istante in cui la luce entra nel tessuto.

$$DPF = c_v \cdot \langle t \rangle / d \cdot n,$$

dove  $c_v$  rappresenta la velocità della luce nel vuoto mentre  $n$  è l'indice di rifrazione del tessuto sotto esame, (tipicamente si lavora con  $n=1.40$  ).

-Metodi di calcolo nel dominio della frequenza: effettuando le misure di spettroscopia nel dominio della frequenza anziché nel dominio del tempo, è possibile controllare in maniera continua il percorso totale della radiazione luminosa all'interno del tessuto e quindi fornire una stima del DPF.

Si considera una radiazione nel vicino infrarosso fornita da un laser in maniera continua, questa sorgente può essere facilmente modulata con frequenze che vanno dalla continua fino ad alcune centinaia di MHz; misurando lo sfasamento tra la luce incidente e quella che esce dal tessuto abbiamo una stima del DPF (figura 10, 5.8).

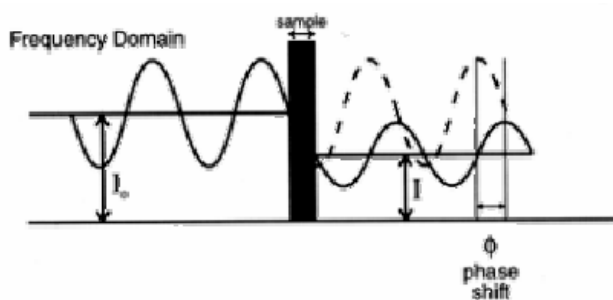


Figura 10 (esempio di sfasamento della luce nel dominio della frequenza)

Se indichiamo con P lo sfasamento suddetto allora possiamo scrivere che:

$$DP = P \cdot c_v / 2\pi \cdot f \cdot n$$

Nelle seguenti due tabelle riporto i valori indicati da Duncan e coll.in un lavoro del 1995 in cui è stato utilizzato uno spettrometro ottico a modulazione di intensità, che misura lo slittamento della fase attraverso il tessuto per determinare la lunghezza del percorso ottico assoluto attraverso il tessuto (Duncant, Meek, Clemencet, Elwell, Tyszczuk, Copet&Delpyt. 1995). Figura 12,13, 5.9

	Total <i>n</i> = 100 (21-59, mediana 33 anni)	F <i>n</i> =50 (21-53, mediana 34 anni)	Male <i>n</i> = 50 (21-59, mediana 31 anni)
<b>690 nm</b>	<b>6.51 ± 1.13</b>	<b>6.74 ± 0.67</b>	<b>6.27 ± 1.42</b>
<b>744 nm</b>	<b>6.53 ± 0.99</b>	<b>6.74 ± 0.67</b>	<b>6.32 ± 1.20</b>
<b>807 nm</b>	<b>6.26 ± 0.88</b>	<b>6.42 ± 0.61</b>	<b>6.09 ± 1.07</b>
<b>832 nm</b>	<b>5.86 ± 0.98</b>	<b>6.07 ± 0.71</b>	<b>5.64 ± 1.16</b>

Figura 12 (valori di DPF e Deviazione Standard della testa di adulti suddivisi fra Maschi e Femmine secondo 4 lunghezze d'onda -Duncan et al 1995)



	Total <i>n</i> = 35	F <i>n</i> = 21	Male <i>n</i> = 14
690 nm	5.38 ± 0.49	5.35 ± 0.51	5.42 ± 0.47
744m	5.11 ± 0.48	5.11 ± 0.53	5.11 ± 0.42
807 nm	4.99 ± 0.45	4.98 ± 0.46	5.00 ± 0.45
832 nm	4.67 ± 0.65	4.62 ± 0.71	4.74 ± 0.56

Figura 13 (valori di DPF e Deviazione Standard della testa di neonati suddivisi fra Maschi e Femmine secondo 4 lunghezze d'onda -Duncan et al 1995)

### 5.10 Calcolo delle concentrazioni

Fino ad ora è stata trattata la teoria alla base della spettroscopia NIR, per poterla applicare manca ancora una fondamentale considerazione: come ricavare le variazioni delle concentrazioni delle sostanze di interesse.

E' importante specificare che, il numero delle variabili incognite, pari al numero delle concentrazioni cercate, (nel nostro caso si tratta di concentrazione di oxi/deoxi-emoglobina), obbliga a dover utilizzare due differenti frequenze-NIR  $\lambda_1$  e  $\lambda_2$ , in modo da ottenere 2 equazioni, rispettivamente per le due frequenze adottate dallo strumento NIRs. Precisamente:

$$\Delta OD(\lambda_1) = [\alpha_{HbO_2}(\lambda_1)\Delta[HbO_2] + \alpha_{Hb}(\lambda_1)\Delta[Hb]] * l * DPF(\lambda_1)$$

$$\Delta OD(\lambda_2) = [\alpha_{HbO_2}(\lambda_2)\Delta[HbO_2] + \alpha_{Hb}(\lambda_2)\Delta[Hb]] * l * DPF(\lambda_2)$$

Risolvendo le equazioni si ottiene:

$$\Delta Hb = \frac{\epsilon^{\lambda_2}_{HbO_2} \cdot \Delta OD^{\lambda_1} - \epsilon^{\lambda_1}_{HbO_2} \Delta OD^{\lambda_2}}{(\epsilon^{\lambda_1}_{Hb} \cdot \epsilon^{\lambda_2}_{HbO_2} - \epsilon^{\lambda_2}_{Hb} \cdot \epsilon^{\lambda_1}_{HbO_2}) \cdot DPF \cdot L}$$

$$\Delta HbO_2 = \frac{\epsilon^{\lambda_1}_{Hb} \cdot \Delta OD^{\lambda_2} - \epsilon^{\lambda_2}_{Hb} \Delta OD^{\lambda_1}}{(\epsilon^{\lambda_1}_{Hb} \cdot \epsilon^{\lambda_2}_{HbO_2} - \epsilon^{\lambda_2}_{Hb} \cdot \epsilon^{\lambda_1}_{HbO_2}) \cdot DPF \cdot L}$$

Tramite queste formule è possibile ricavare anche i seguenti parametri:

-consumo d'ossigeno :

$$OD_{oxy} = OD_{\lambda 1} - OD_{\lambda 2}$$

-variazione di concentrazione totale di emoglobina, cioè il volume del sangue nella regione indagata:

$$ODBV = OD_{\lambda 1} + k OD_{\lambda 2},$$

dove k è un fattore correttivo per ridurre la correlazione tra la variazione del volume sanguigno e l'ossigenazione.

## 5.11 Conclusioni

Tramite l'applicazione delle varie formule da parte dei ricercatori in fisica, utilizzando modelli (fantom) rappresentativi dei componenti principali costituenti i vari strati a seconda dei tessuti biologici ed eseguendo misure a diverse distanze tra sorgente e rivelatore, è possibile creare il sistema di equazioni necessario per il calcolo dei coefficienti di assorbimento e scattering del mezzo e questo protocollo di misura è detto **“multi-distance”**. A causa della natura diffusiva della propagazione della luce in un tessuto, solamente i fotoni che sono in profondità nel tessuto hanno probabilità di arrivare al rivelatore, quindi il volume esplorato tra sorgente e rivelatore è un fascio curvo con una profondità massima, utilizzando una intensità di luce infrarossa a bassa potenza (non superiore ai 3 mW), di circa  $\frac{1}{2}$  la distanza tra emettitore e detettore, con una profondità media di circa di  $\frac{1}{4}$  della distanza sorgente – rivelatore (figura 11, 5.11)

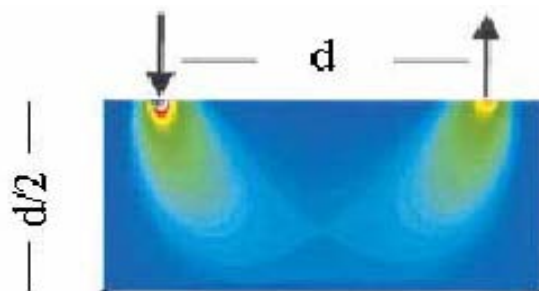


Figura 11 (esempio di profondità di rilevazione in relazione alla distanza degli elettrodi)

## Capitolo 6

### Dalla teoria alla pratica: progettazione della cuffietta prototipo

#### 6.1 Caratteristiche generali del probe per il Nirs: materiali selezionati ed utilizzati

La cuffietta per essere idonea a questa tecnica di indagine funzionale non invasiva, deve rispettare alcune caratteristiche:

- deve essere leggera,
- deve poter aderire a tutta la superficie cranica ed impedire alle fonti di illuminazione esterne di penetrare,
- deve poter ospitare gli optodi delle fibre ottiche mantenendoli ben saldi e perpendicolari alla superficie cranica,
- deve essere sufficientemente morbida in modo da essere invasiva il meno possibile e non arrecare danni alla delicata pelle del bambino,
- deve essere facilmente sterilizzabile, tramite appositi solventi o in acqua bollente,
- deve essere facilmente e velocemente posizionabile sulla testina in base alle aree di interesse,
- deve potersi auto sostenere in maniera stabile e nella misura meno invasiva possibile.

Per rispettare queste caratteristiche sono stati fin dall'inizio selezionati dei materiali che costituiscono tutt'ora i componenti di base delle cuffiette di nuova generazione, realizzate proprio in base ai test sperimentali con i neonati.

Il materiale selezionato per la realizzazione della prima cuffietta è stato ricavato da un tappetino di mouse del PC. Questo tappetino, di fattura non recente e di spessore di quasi un cm, era composto da un materiale gommoso particolarmente resistente alle sollecitazioni meccaniche.

Resistente alla trazione, alla pressione, al piegamento, al calore e nonostante questo leggerissimo e malleabile, tagliabile e forabile, utilizzando strumenti adeguati. Il materiale di cui è composto è il neoprene. Il neoprene (originalmente denominato duprene) è stato il primo residuo della gomma sintetica prodotto a larga scala. Esso appartiene alla famiglia degli elastomeri di sintesi (ovvero delle gomme sintetiche) e si presenta come una gomma di varia porosità, la cui massa è costituita da cellule gassose uniformemente distribuite. Le principali caratteristiche sono:

- Elasticità.
- Resistenza al taglio e allo schiacciamento.
- Resistenza all'invecchiamento atmosferico e al calore.
- Inoltre risulta essere inerte verso molti agenti chimici, olii e solventi.

Per questi motivi trova importanti applicazioni nel campo dell'industria chimica, automobilistica, nautica, e nella realizzazione di raccordi, guarnizioni, rivestimenti protettivi e indumenti (ad esempio, mute subacquee).

Il materiale utilizzato per la realizzazione dei supporti per gli optodi delle fibre ottiche è alluminio, tubetti del diametro esterno di 12 mm e diametro interno di circa 9 mm allargato e portato fino a 10 mm. Alcune delle caratteristiche principali dell'alluminio sono le seguenti:

- Basso peso specifico, pari a circa un terzo di quello dell'acciaio o delle leghe di Rame
- Elevata resistenza alla corrosione.
- Alta conducibilità termica ed elettrica
- Elevata plasticità
- Eccellente duttilità e malleabilità
- Basso potere radiante
- Difficile saldabilità

Alcuni dei molti campi in cui viene usato l'alluminio sono:

- Trasporti (in quasi ogni tipo di mezzo di trasporto)
- Imballaggio (lattine, pellicola d'alluminio, ecc.)
- Costruzioni (finestre, porte, strutture per facciate continue, rivestimenti metallici, in lamiera scatolata alla pressopiegatrice ecc.)
- Beni di consumo durevoli (elettrodomestici, attrezzi da cucina, ecc.)
- Linee di trasmissione elettrica (a causa del suo peso leggero, anche se la sua conduttività elettrica è solo il 60% di quella del rame)
- Macchinari.

## **6.2 Preparazione dei materiali, strumentazione utilizzata e tecnica di realizzazione**

Per costruire la cuffietta sono stati utilizzati alcuni strumenti facilmente reperibili: per realizzare i fori sul neoprene, tutti con la medesima circonferenza, è stata utilizzata una fustella circolare con manico e diametro 12 mm. Il neoprene è stato tagliato con un sottile e lungo coltello (i coltelli solitamente utilizzati per tagliare il prosciutto a mano) opportunamente arrotato con un apposito affilacoltelli. I fori e i tagli sono stati eseguiti sopra un ceppo di legno (figura 1, 6.2).



Figura 1 (strumenti utilizzati per tagliare e forare il neoprene)

Sul neoprene è stata disegnata la matrice  $3 \times 3$  rappresentante la posizione del centro dei nove fori per i supporti degli optodi, distanti 1,8 cm l'uno dall'altro (Figura 2, 6.2).

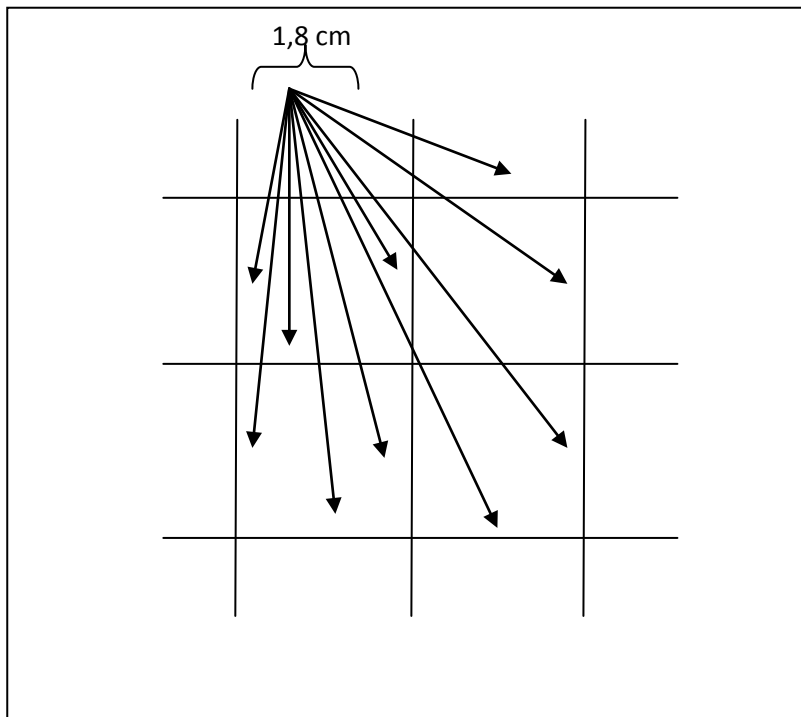


Figura 2 (matrice  $3 \times 3$  e relative distanze tra i centri dei fori per gli optodi)

Sulla matrice sono stati tracciati, sia orizzontalmente, sia verticalmente, 4 piccoli segmenti, corrispondenti ai punti cardinali di ogni circonferenza da creare. Questi segnetti sono utili per compiere fori precisi ed equidistanti (Figura 3, 7.2).

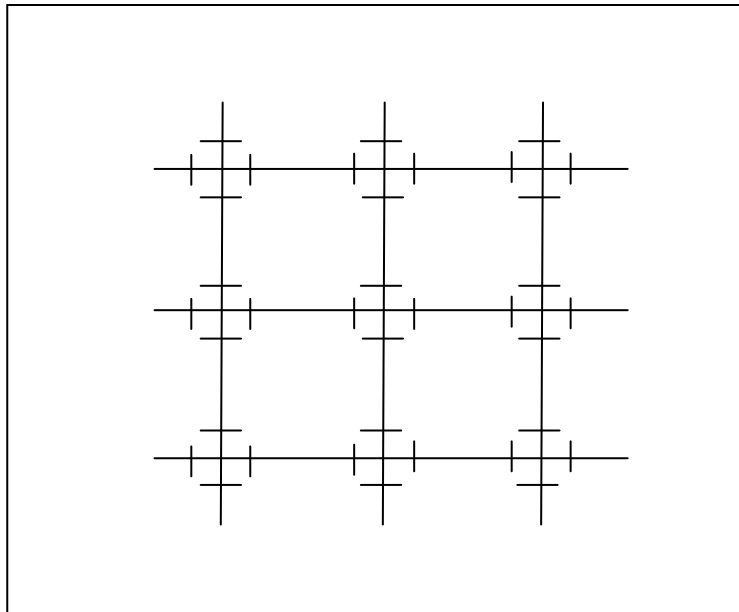


Figura 3 (tracciamento delle traccie per compiere i fori)

Il neoprene è stato tagliato con il coltello, lasciando un bordo di 9 mm, poi forato con la fustella rispettando la matrice illustrata precedentemente (Figura 4, 6.2).



Figura 4 (esecuzione dei fori)

I 9 cilindretti di neoprene asportati per realizzare i fori sono stati conservati per essere riutilizzati, come si vedrà nelle immagini di seguito riportate.

Un tubetto di alluminio è stato segmentato in 9 tubetti della lunghezza di 22 mm ciascuno; per far questo, sono stati tracciati con un pennarello dei punti di riferimento direttamente sul tubetto. A partire dall'inizio del tubo, è stata tracciata una lineetta dopo 17 mm e un'altra dopo 22 mm. In un secondo momento, partendo dall'indicatore di 22 mm è stato tracciato un altro segno dopo 17 mm e un altro dopo 22 mm e così via fino alla fine del tubetto. Il segno corrispondente a 17 mm, serve per creare una incisione di circa un 1/3 della circonferenza del tubetto. Tale incisione ospiterà una guarnizione O-Ring, di diametro 10 mm, utilizzato come piccolo elastico per tenere bloccato, pressandolo da un lato, l'optodo contenente la fibra ottica (figura 5, 6.2).

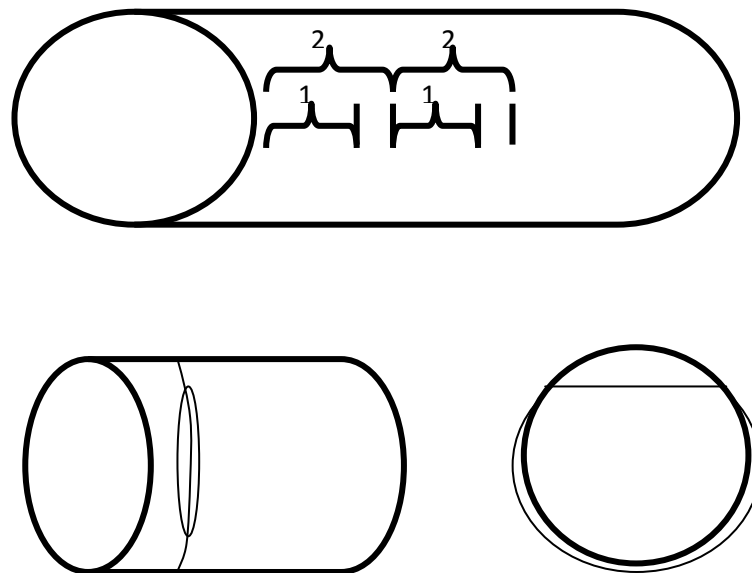


Figura 5 (tracciatura del tubo di alluminio per la segmentazione)

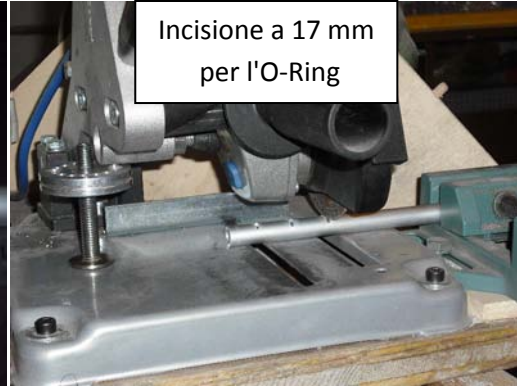
### 6.3 Realizzazione del primo prototipo: strumenti e tecnica di lavorazione

La tecnica di lavorazione verrà esposta attraverso alcune immagini che descrivono la sequenza con cui tutti i componenti della cuffietta vengono preparati per poi essere assemblati (Sequenza 1, 6.3).

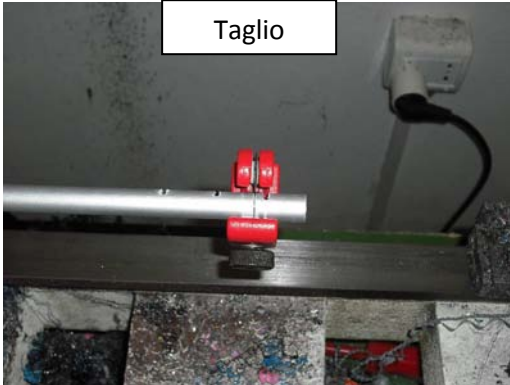
Realizzazione dei segni per l'O-Ring e il taglio



Incisione a 17 mm per l'O-Ring



Taglio



Fresatura 10 mm



Rimozione sbavature esterne



Rimozione sbavature interne



Tornitura



Lucidatura









Sequenza 1 (realizzazione del probe)

Come si può notare dalle ultime figure, l'inserimento a pressione delle guarnizioni coniche, favorisce una naturale concavità alla superficie della cuffietta, rendendola complementare alla superficie cranica. Ciò ne favorisce l'aderenza ed impedisce alla luce esterna di penetrare.

#### 6.4 Calcolo della distanza interoptodica

Analizzando la letteratura riguardante la distanza interoptodica utilizzata nei neonati si nota come, in genere, sia compresa tra 15 e 20 mm. Nel nostro caso è stato scelto un valore di 18 mm, vediamo per quale ragione.

La stima della distanza media tra superficie cranica e cervello, è importante per capire quali distanze interoptodiche utilizzare per poter analizzare la corteccia cerebrale del neonato, con spessore di 2-4mm, utilizzando la minor potenza possibile dello strumento Nirs.

Tramite le immagini DICOM (*Digital Imaging and Communications in Medicine*, immagini e comunicazione digitali in medicina) di un campione di neonati di 3 mesi, gentilmente fornite dal reparto di Radiologia ad indirizzo Pediatrico dell'ospedale Burlo Garofolo di Trieste, si può visualizzare la struttura ossea e cerebrale del neonato; la visualizzazione è possibile sia come sequenza di immagini che progressivamente rappresentano i vari strati "fotografati" in successione durante la radiografia, sia in forma tridimensionale, cioè ricostruendo dalle singole immagini, l'intera struttura cranica e cerebrale del neonato, con la possibilità di penetrare più o meno in profondità la superficie ossea e compiere misure sulla distanza tra cranio e corteccia. Per questo

genere di misurazioni, ci sono a disposizione software scaricabili dalla rete, sia a pagamento che gratuiti. Si consiglia OsiriX per Mac e ImageJ per PC. Nel nostro caso si è utilizzato ImageJ (ImageJ 1.41 Wayne Rasband National Institutes of Health <http://rsb.info.nih.gov/ij>). Un esempio di sequenza di immagini Dicom può essere vista nella seguente figura (figura 6, 6.4).

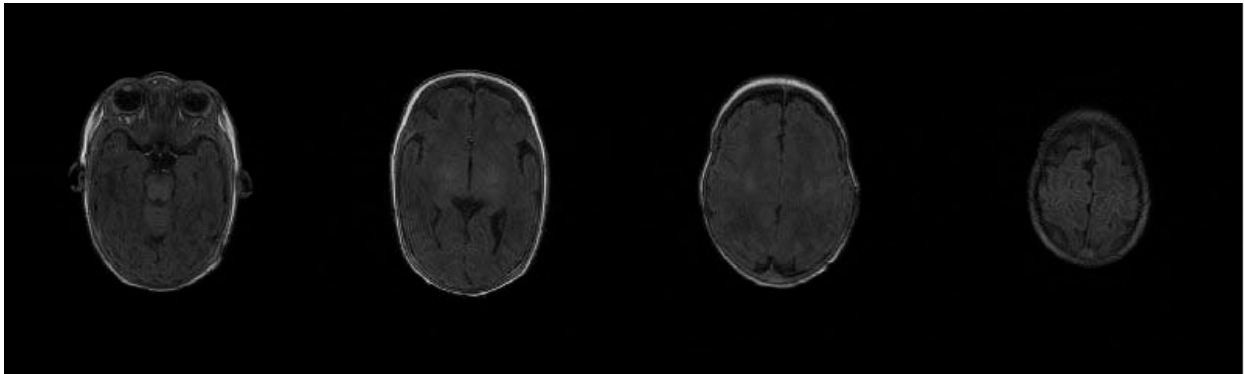


Figura 6 (immagini Dicom)

Un esempio di ricostruzione tridimensionale, può essere visto nella figura seguente (figura 7, 6.4).

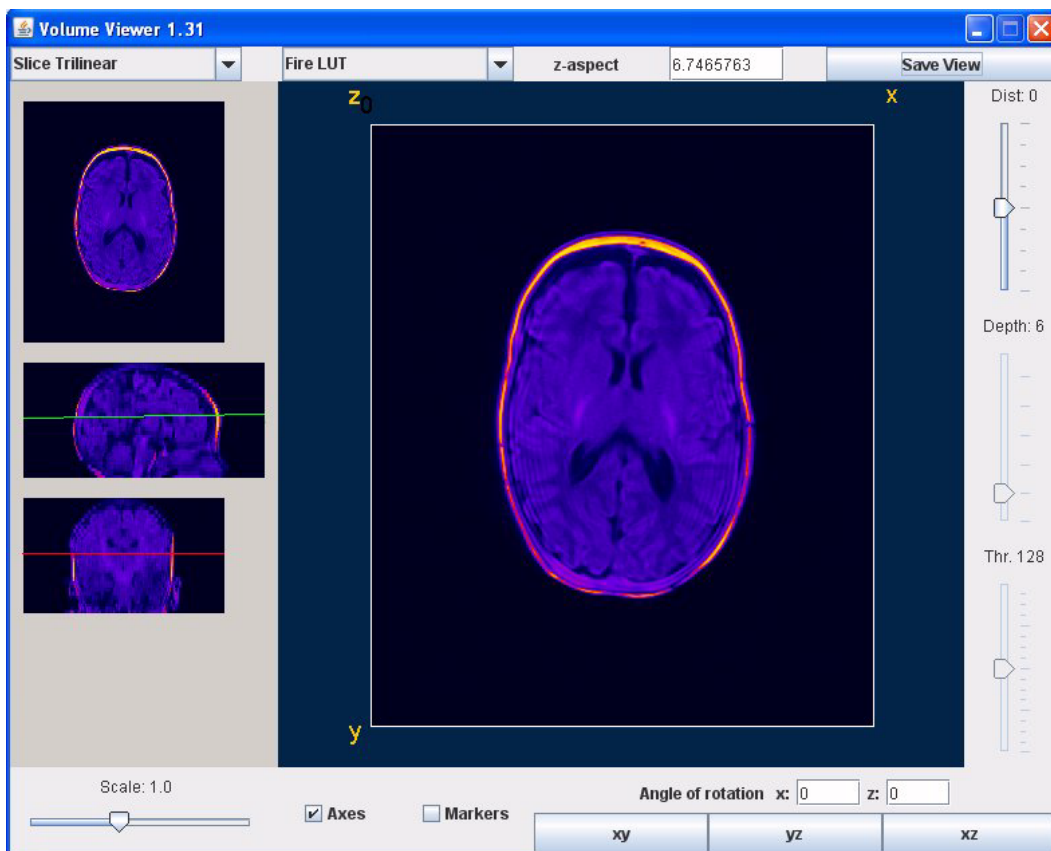


Figura 7 (ricostruzione 3D tramite Volume Viewer diImageJ)

Come si può notare dalle varie immagini, la struttura ossea del cranio del neonato di 3 mesi, è ancora molto sottile ed in alcuni punti (fontanelle), le varie ossa componenti del cranio, non sono ancora ben saldate le une alle altre. Chiaramente nel neonato di qualche ora di vita, la struttura cranica è ancor meno strutturata. Tenendo conto di queste considerazioni, tramite il software ImageJ, si possono misurare le distanze in pixel tra la superficie cranica e la corteccia cerebrale, utilizzando varie proiezioni (sagittali e ortogonali) di un campione di soggetti sottoposti a RMN. Un esempio è mostrato nella figura 3. La media in pixel di tutte le distanze, convertita in millimetri, fornisce il valore in mm da utilizzare per calcolare la distanza interoptodica (figura 8, 6.4).

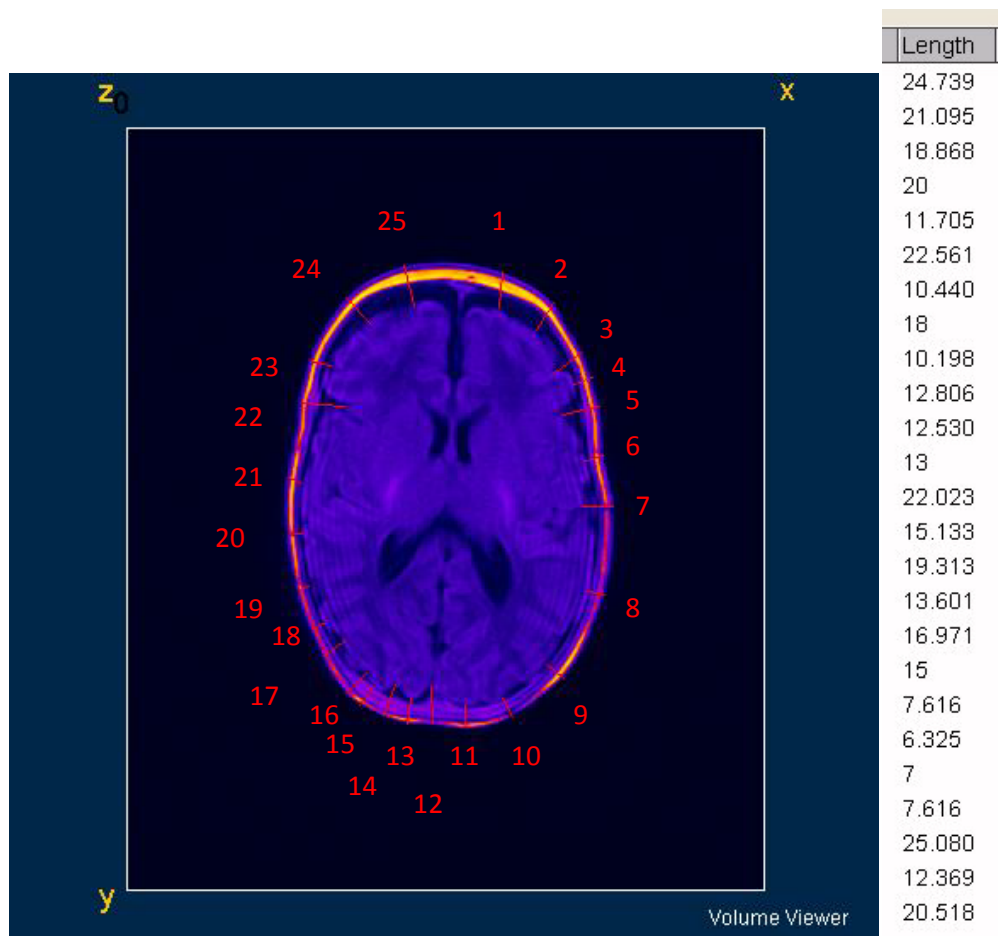


Figura 8 (esempio delle distanze in pixel tra superficie cranica e corteccia cerebrale)

La somma di tutte le distanze diviso il numero delle distanze, permette di ottenere il valore medio della distanza in pixel relativamente a quella prospettiva. La somma dei valori medi di ogni prospettiva presa in considerazione, diviso il numero delle prospettive, ci fornisce il valore medio in pixel che è stato convertito in mm per calcolare la distanza interoptodica. Dividendo la lunghezza orizzontale in mm del monitor per la risoluzione orizzontale adottata, si ottiene la dimensione in mm di ogni pixel sull'asse X ( $330/1280=0,2578125$ ). Ripetendo il calcolo per la lunghezza verticale si ottiene la misura di ogni pixel sull'asse Y ( $208/800=0,26$ ). Approssimando per eccesso il valore sull'asse X a 0,26, in modo che coincida con quello sull'asse Y, e moltiplicandolo col valore

stimato tramite le immagini Dicom ( $0,26 \cdot 15,732 = 4,09032$ ), si ottiene la profondità media della corteccia rispetto la superficie cranica del campione di riferimento, che è circa 4 mm. Così la profondità media da coprire con la luce del sistema Nirs è di circa 4 mm. Dato che il Nirs consente di raggiungere a bassa potenza una profondità massima di circa metà della distanza tra emettitore e detettore, con una profondità media di circa  $\frac{1}{4}$  della distanza, si è potuto così ricavare una distanza interoptodica di 18 mm, con una profondità media stimata intorno ai 4 - 4,5 mm (figura 9, 6.4).

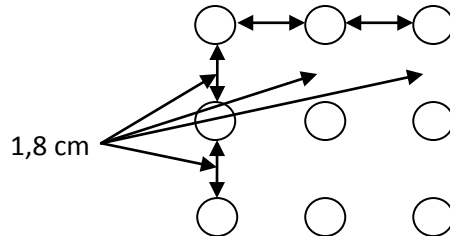


Figura 9 (distanza interoptodica calcolata in base alla tecnica precedentemente descritta)



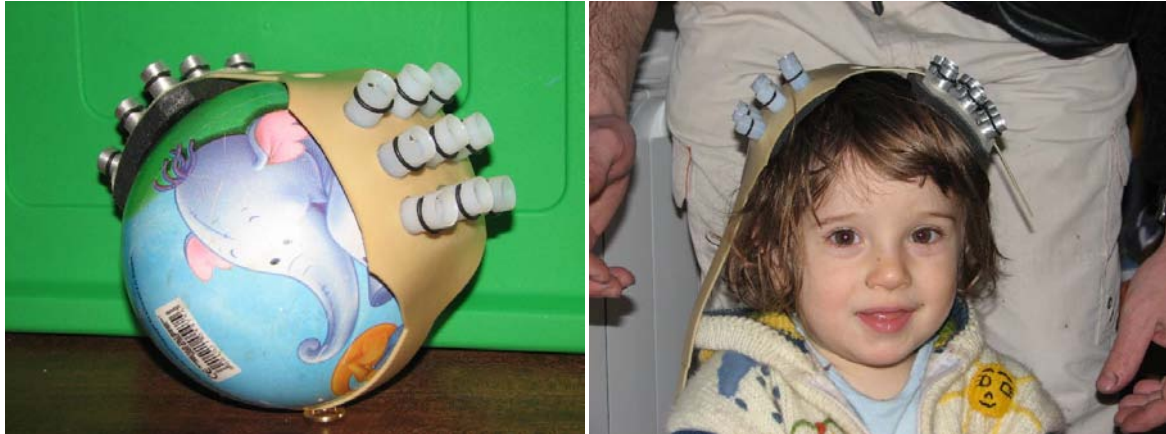
## Capitolo 7

### Dal prototipo alla prima cuffietta definitiva: realizzazione della cuffietta Base

#### 7.1 Progettazione del supporto del probe

La cuffia prototipo, dotata di nove fibre ottiche e 12 canali, è stata testata in fase sperimentale su un campione di neonati a termine ed uno pretermine. In base alle aree cerebrali sotto indagine, è stata ancorata alla testina tramite garza elastica sterile o tenuta con le dita della mano. Dati i risultati inaspettatamente soddisfacenti, in rapporto al segnale –rumore dei 12 canali, si è deciso di realizzare la cuffietta definitiva, dotata di due unità simmetriche, con 9 optodi ciascuna e un totale di 24 canali. Ecco alcune immagini che descrivono il tentativo di tenere insieme le due unità e nello stesso tempo renderle distanziabili ed ancorabili sulla testina (sequenza 1,7.1)





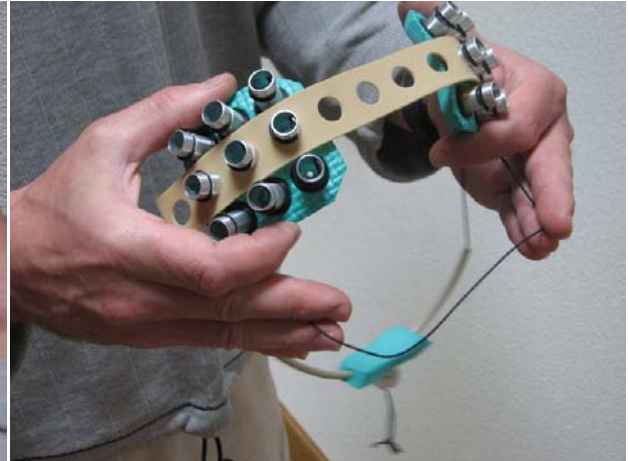
Sequenza 1 (cuffietta prototipo)

### 7.1.1 Realizzazione del supporto per il probe: probe Base

La relativa difficoltà e praticità nell'indossarla ha comportato la ripianificazione del progetto e la realizzazione della prima serie di cuffie definitive, denominate base. Le due unità, del tutto analoghe al prototipo, sono state realizzate con materiale neoprene ricavato dai tappetini da gioco dei bambini. Questo tipo di neoprene, con porosità più fine e consistenza maggiore rispetto quello del tappetino per il mouse precedentemente utilizzato, conserva tutte le caratteristiche appartenenti a questo tipo di materiale e in più è ancora più resistente alle sollecitazioni meccaniche. Le due unità sono tenute insieme da una sottile fascia di gomma che si inserisce sui tubetti di alluminio di entrambe le unità. E' dotata di più fori, i cui centri sono distanti 18 mm l'uno dall'altro, che



possono essere selezionati in base alla distanza che si intende utilizzare, in relazione alle aree cerebrali sotto indagine. L'ancoraggio sulla testina è stato realizzato utilizzando un sottilissimo filo elastico che dalla nuca, passando dietro i due tubetti di alluminio alle estremità della fila centrale, viene tirato con un apposito morsetto sotto il mento del bambino, al di sotto di una piccola mentoniera in neoprene (sequenza 2,7.1.1).







### Sequenza 2 (cuffietta base)

Questa volta l'ancoraggio ha soddisfatto le aspettative, stabile, veloce da indossare e molto poco invasivo. Questo primo modello è stato testato in fase sperimentale ed è tutt'ora utilizzato insieme agli altri di nuova generazione. Ecco alcune immagini durante il primo test in fase sperimentale (sequenza 3, 7.1.1)





Sequenza 3 (cuffietta base utilizzata durante un 'esperimento)

Di seguito è mostrata la tecnica di costruzione della mentoniera (sequenza 4, 7.1.1).







Poi dall'altro lato, in modo che i due fori convergano (vista dall'alto)



Poi dall'altro lato, in modo che i due fori convergano (vista dal basso)



Si allarga un foro



Si inserisce un tubetto di gomma



Si allarga l'altro foro



Si inserisce l'altro tubetto di gomma



I tubetti visti dal basso



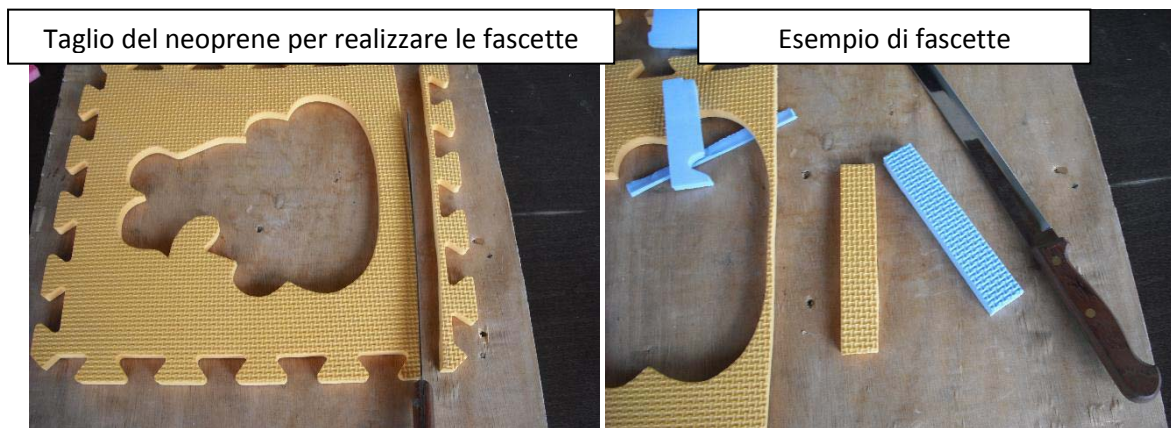
Si passa l'elastico all'interno dei due tubetti



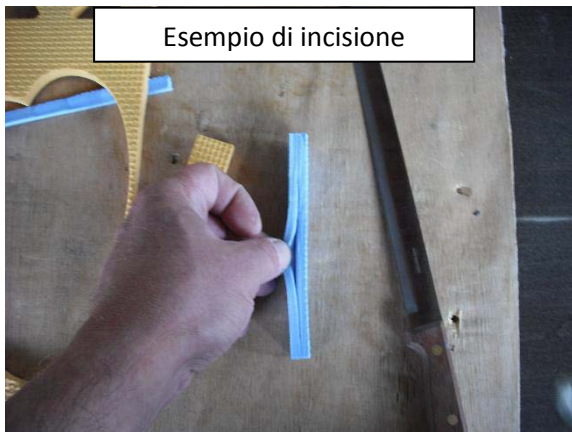
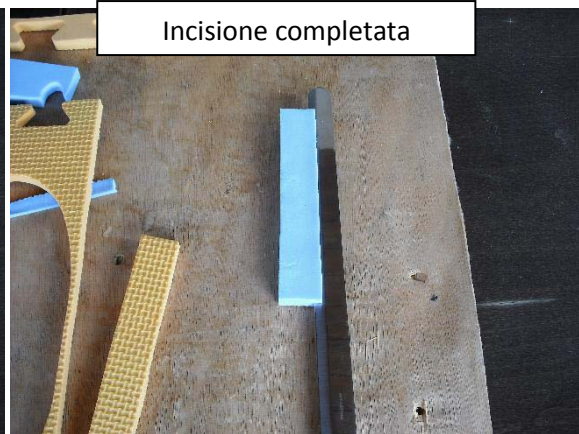
Sequenza 4 (realizzazione della mentoniera)

## 7.2 Progettazione e realizzazione del Probe Malleabile

L'esigenza sperimentale di analizzare aree cerebrali bilaterali sia temporo –parietali che occipito frontali, con la possibilità di ancorare velocemente e stabilmente le cuffie, ha portato alla realizzazione di un nuovo sistema. Per risolvere il problema si è ricorsi ad una struttura a croce in neoprene, dotata di anima metallica. La fascetta di gomma forata, è stata sostituita da una coppia di fascette in neoprene, saldate perpendicolarmente tra di loro, formando così una croce. Su ogni fascetta, su entrambi i lati e per tutta la lunghezza, è stata realizzata una piccola incisione con il coltello, e nell'incisione è stato inserito e saldato con colla cianoacrilica, un sottile filo metallico zincato e ricoperto di plastica (il classico filo color verde che si usa per riparare le reti metalliche). Di seguito sono mostrate alcune immagini che descrivono la tecnica di costruzione (sequenza 5, 7.2).





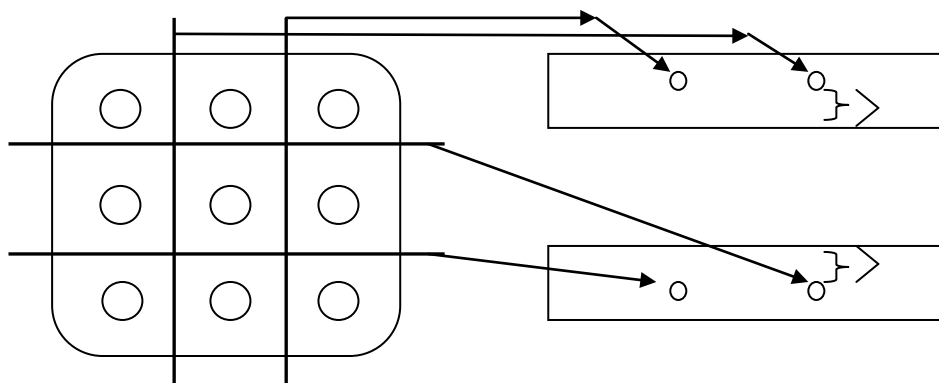




Sequenza 5 (realizzazione del supporto a croce con anima metallica, per tenere unite le due cuffiette)

L'idea di animare con sottile filo di ferro la struttura portante delle cuffie è stata poi estesa alle cuffie stesse. Il particolare innesto del supporto per l'optodo con la guarnizione conica, garantisce una naturale concavità della cuffia solo se i supporti sono posti vicini gli uni agli altri.

Per distanze superiori ai 20 - 25 mm, è stato adottato il sistema di animazione. All'interno di ogni cuffietta sono stati apportati 4 fori passanti riempiti con 4 fili metallici, opportunamente tagliati e saldati. I fori sono stati ricoperti da un apporto cilindrico di neoprene (sequenza 6, 7.2).





Foratura del neoprene con utensile appuntito (vista lato della foratura)



Foratura del neoprene con utensile appuntito (vista lato opposto)



Foratura per l'inserimento del secondo filo metallico



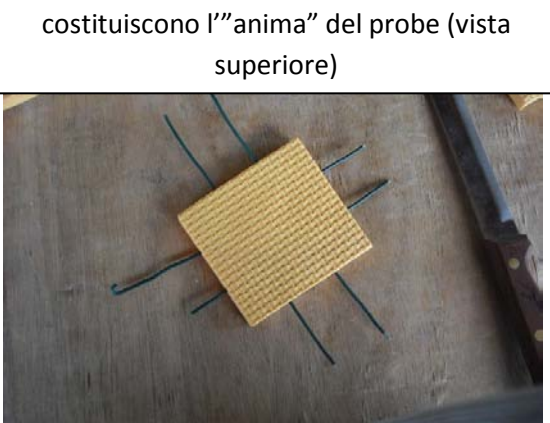
Foratura per l'inserimento del terzo filo perpendicolare agli altri due



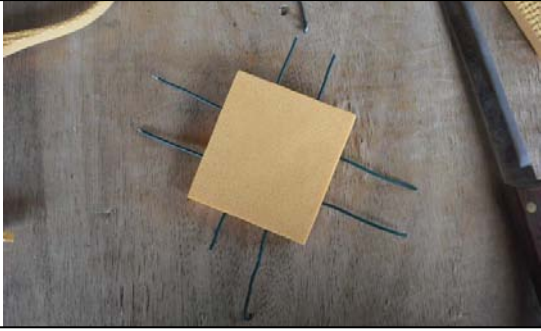
Foro perpendicolare (vista dal lato della fuoriuscita del metallo)



Inserimento dei 4 fili metallici che costituiscono l'"anima" del probe (vista superiore)



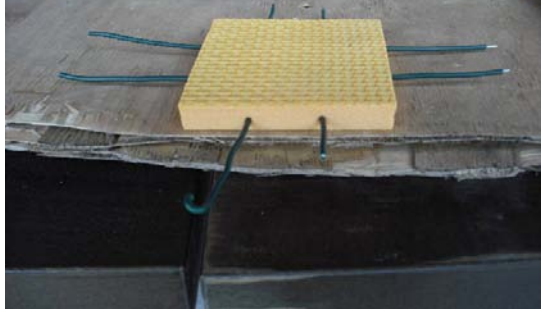
Inserimento dei 4 fili metallici che costituiscono l'"anima" del probe (vista inferiore)



Inserimento dei 4 fili metallici che costituiscono l'"anima" del probe (vista laterale)



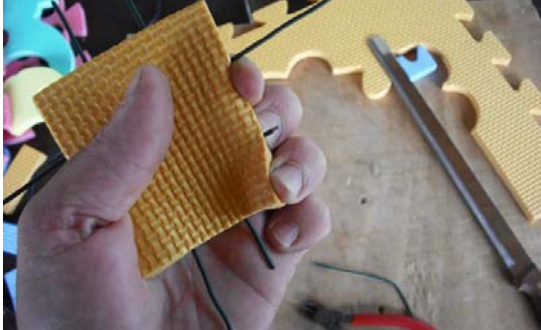
Inserimento dei 4 fili metallici che costituiscono l'"anima" del probe (vista laterale/altro lato)



Taglio di un capo del filo



Compressione del probe per consentire il taglio dell'altro capo del filo



Taglio dell'altro capo del filo



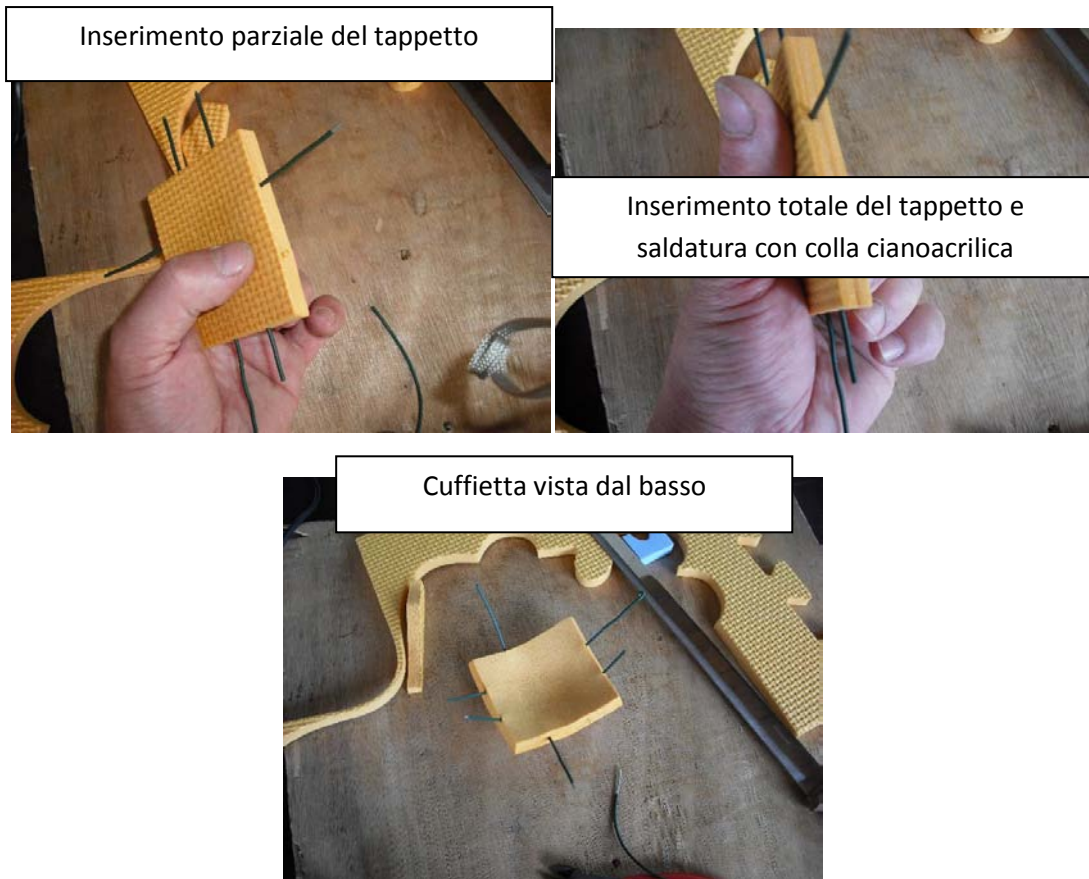
Preparazione del tappetto per coprire il foro



Tappetto







Sequenza 6 (realizzazione delle cuffiette malleabile, con anima metallica che consente un facile adattamento alla superficie cranica)

### 7.2.1 Istruzioni di montaggio del probe malleabile in base alle aree di interesse

La cuffia consente la rilevazione sia delle aree temporo-parietali che occipito-frontali.

Rilevazione occipito-frontale (figura 1 / 2, 7.2.1).

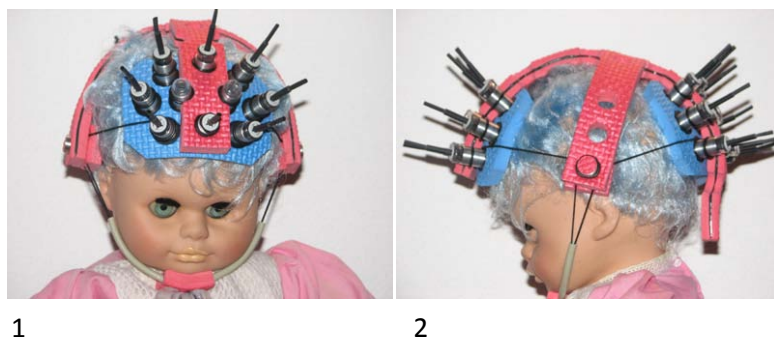


Figura 1 e 2 (esempio di rilevazione occipito-frontale)

I due probe sono posizionabili a vari livelli in base alla circonferenza cranica.

## 7.2.2 Rilevazione parieto-temporale

Estrarre i due probe togliendo optodi e O-Ring dalla rispettiva sede (fig 3, 7.2.2).

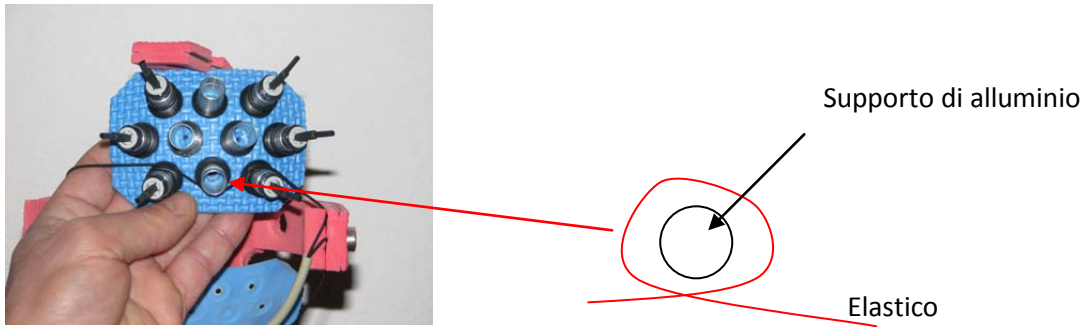


Figura 3 (preparazione della cuffia)

Estrarre i due supporti laterali, rimuovendo l'O-Ring dalla rispettiva sede (figura. 4, 7.2.2).

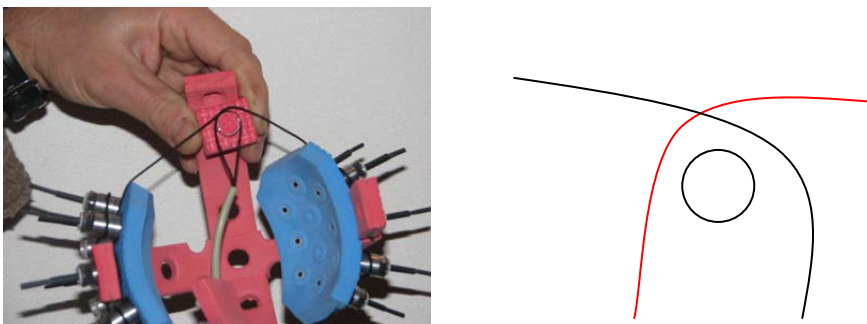
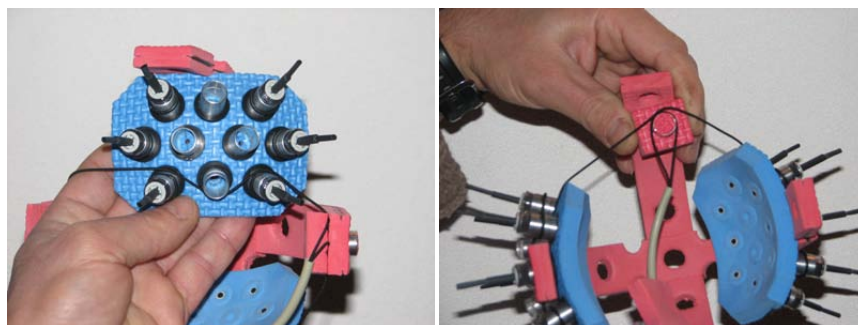


Figura 4 (preparazione dei supporti a croce)

Fare attenzione al corretto posizionamento degli elastici.

Riposizionare i due probe invertendo la posizione degli elastici (figura. 5 / 6, 7.2.2).



5

6

Figura 5 e 6 (riposizionamento delle cuffie e degli elastici)

Inserire di nuovo tutti gli O-Ring di fissaggio (figura 7 / 8,7.2.2).



7

8

Figura 7 e 8 (installazione delle cuffie)

Ecco alcune foto che mostrano un'altro modello di probe realizzato con doppia unità tenuta insieme dal supporto a croce. In questo caso le due fasce di neoprene animate che costituiscono la struttura a croce, sono sovrapposte l'una all'altra (sequenza 7, 7.2.2).



Sequenza 7 (altro modello con supporto a croce divisibile)

Nel caso la rilevazione sia relativa alle sole aree parieto - temporali, questo modello consente di rimuovere la fascia che si estende da Inion a Nasion (due punti di riferimento del Sistema Internazionale 10-20, trattati nel cap. 8) può essere ancorato con la stessa modalità delle cuffiette base.

Nella figura che segue è riportata l'immagine con un esempio di malleabilità di questo genere di cuffia (figura 9, 7.2.2).





Figura 9 (esempio di malleabilità della cuffia)

### 7.3 Progettazione e realizzazione del probe Deformabile

La cuffia deformabile è nata dalla necessità di utilizzare lo strumento Nirs sui neonati nati pretermine. La piccola dimensione cranica e la necessità di analizzare la più vasta superficie cerebrale possibile, ha dato l'avvio ad un nuovo progetto: un probe con 16 optodi ed un totale di 24 canali. La tecnica di animare tramite filo metallico il neoprene è stata inizialmente utilizzata per tentare di costruire una cuffietta animata con matrice 4 \* 4 (sequenza 8, 7.3).



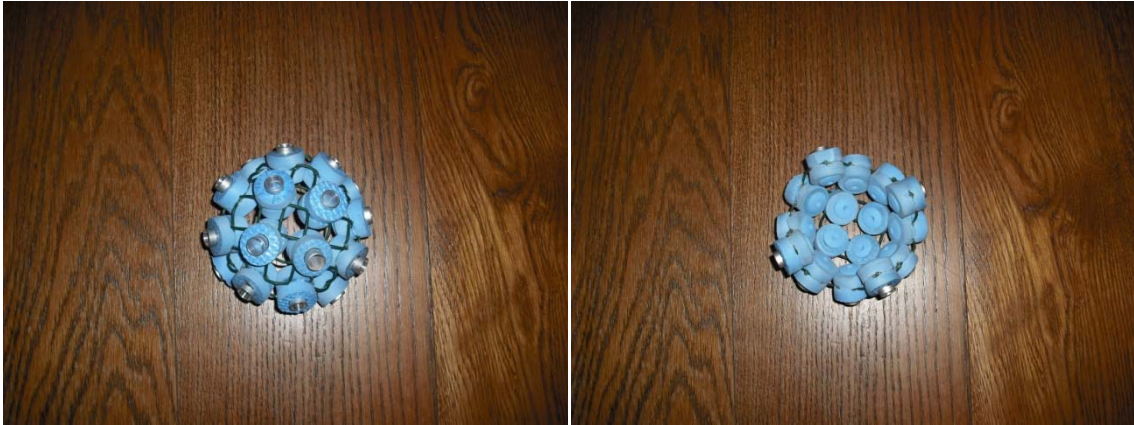


Sequenza 8 (prototipo di cuffia deformabile)

Nonostante le incisioni verticali e orizzontali, tentativo di rendere il più possibile indipendenti gli optodi gli uni dagli altri, il probe appariva ingombrante e difficilmente adattabile alla piccola superficie cranica per cui era stato ideato. Il tentativo successivo è stato quello di costruire il probe direttamente sopra una superficie sferica (una piccola palla di gomma) utilizzando una sorta di plastilina e il filo di ferro zincato ricoperto di plastica. Sono stati realizzati 32 anelli in neoprene con diametro esterno di 25 mm entro i quali inserire i tubetti di alluminio (sequenza 9, 7.3).







Sequenza 9 (prototipo di cuffia deformabile con telaio a rete)

Il risultato è stato soddisfacente. La superficie di copertura era notevole tanto quanto la possibilità di adattare il probe allargandolo o restringendolo a piacimento. La mole di lavoro, la rigidità della struttura in metallo e la sensazione di ingombro percettivo, ha portato a pianificare un nuovo progetto da cui è nata la cuffia deformabile.

E' stata conservata l'idea di sostituire la cuffia in neoprene con tanti anelli separati, corrispondenti al numero degli optodi. E' stata conservata anche l'idea della coppia di anelli che comprimono serrandosi sulla matrice in metallo che costituisce la struttura portante del probe. L'anima in metallo è stata sostituita con rete metallica zincata, tagliata in modo che tutti i supporti degli optodi fossero indipendenti (figura 10, 7.3).

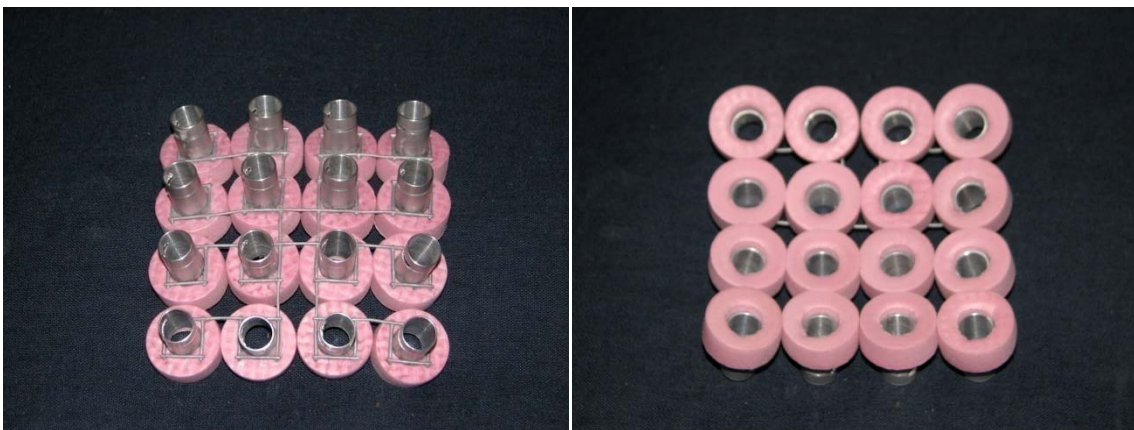
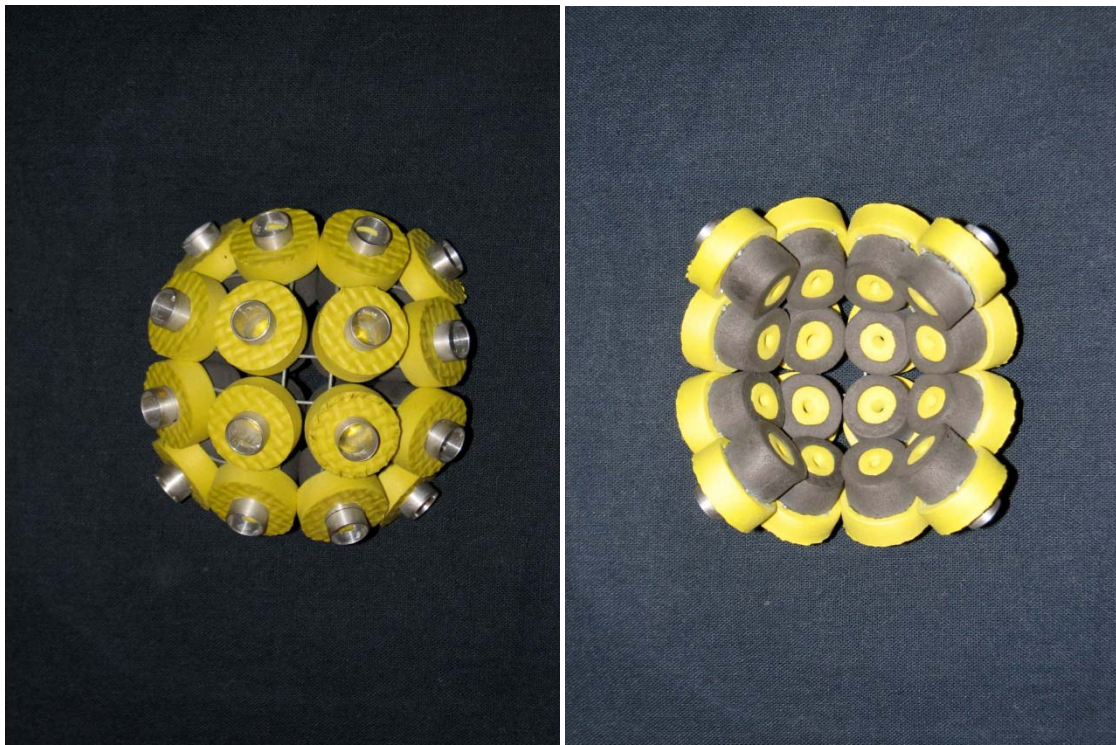


Figura 10 (cuffietta deformabile con matrice 4 \* 4 e telaio a rete presaldato)

Come si può vedere dalla figura 1, la vicinanza tra i vari supporti, limita in questo caso la possibilità di adattare la concavità del probe rendendola complementare alla piccola superficie cranica del neonato pretermine. Così si è deciso di modificare il diametro esterno degli anelli a contatto con la testa, riducendolo a 12 mm (sequenza 10, 7.3).





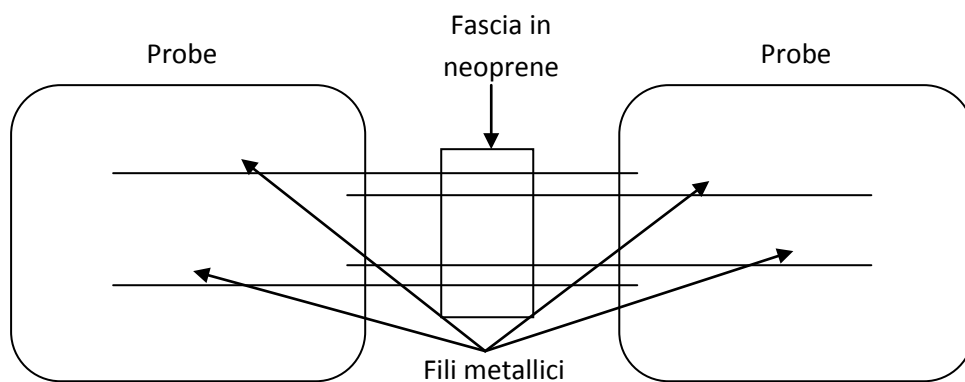


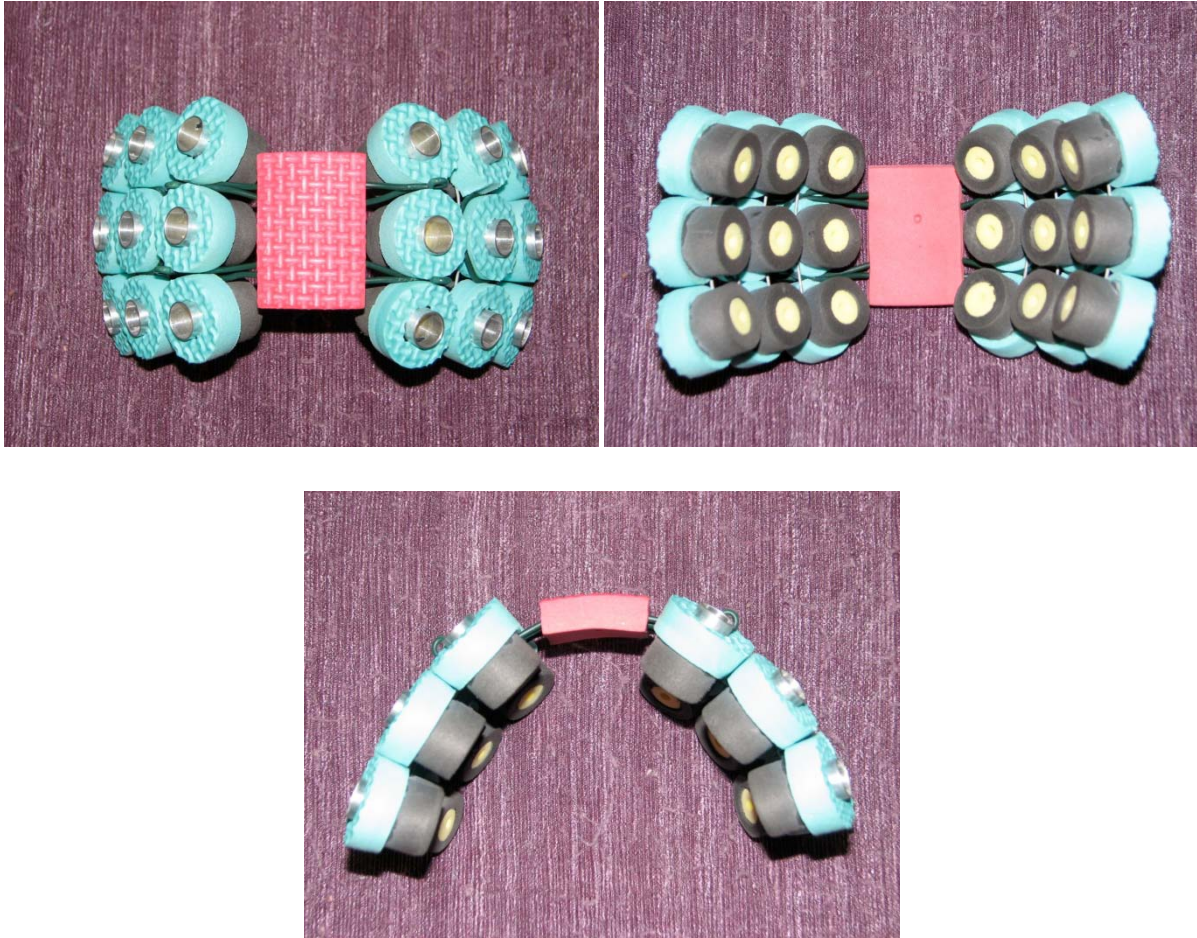
Sequenza 10 (esempio di malleabilità e aderenza della cuffia deformabile)

Nella sequenza 10 è mostrata la versione definitiva della cuffietta deformabile, in cui è chiaramente visibile la capacità di aderire perfettamente con la superficie dell'oggetto su cui è appoggiata, in questo caso una piccola lampadina ad incandescenza.

La nuova tecnica di costruzione è stata adottata anche per realizzare due nuovi probe con matrice  $3 * 3$ , tenuti insieme da due sottili coppie di fili metallici zincati ricoperti di plastica.

Entrambe le coppie di fili passano all'interno di un supporto in neoprene e consentono la regolazione della distanza tra i due probe, in base alle aree cerebrali indagate (sequenza 11, 7.3).





Sequenza 11 (tecnica di costruzione della cuffia deformabile con l'immagine della cuffia definitiva)

La tecnica di ancoraggio sulla testina è la medesima utilizzata nella cuffia base, cioè elastico, mentoniera e morsettiera. Nel caso l'interesse sia rivolto alle aree occipito - frontali, è possibile ancorare le due unità stringendole con l'elastico l'una contro l'altra (figura 11, 7.3).



Figura 11 (tecnica di ancoraggio sulla testa del bimbo)

Nella figura che segue è visualizzato un probe a due unità in cui l'unità di destra è stato completamente deformato (figura 12, 7.3).



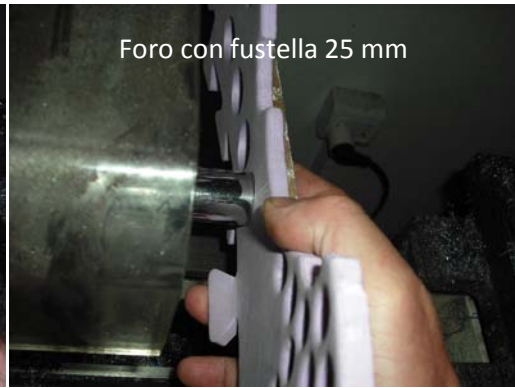
Figura 12 (esempio di deformabilità)

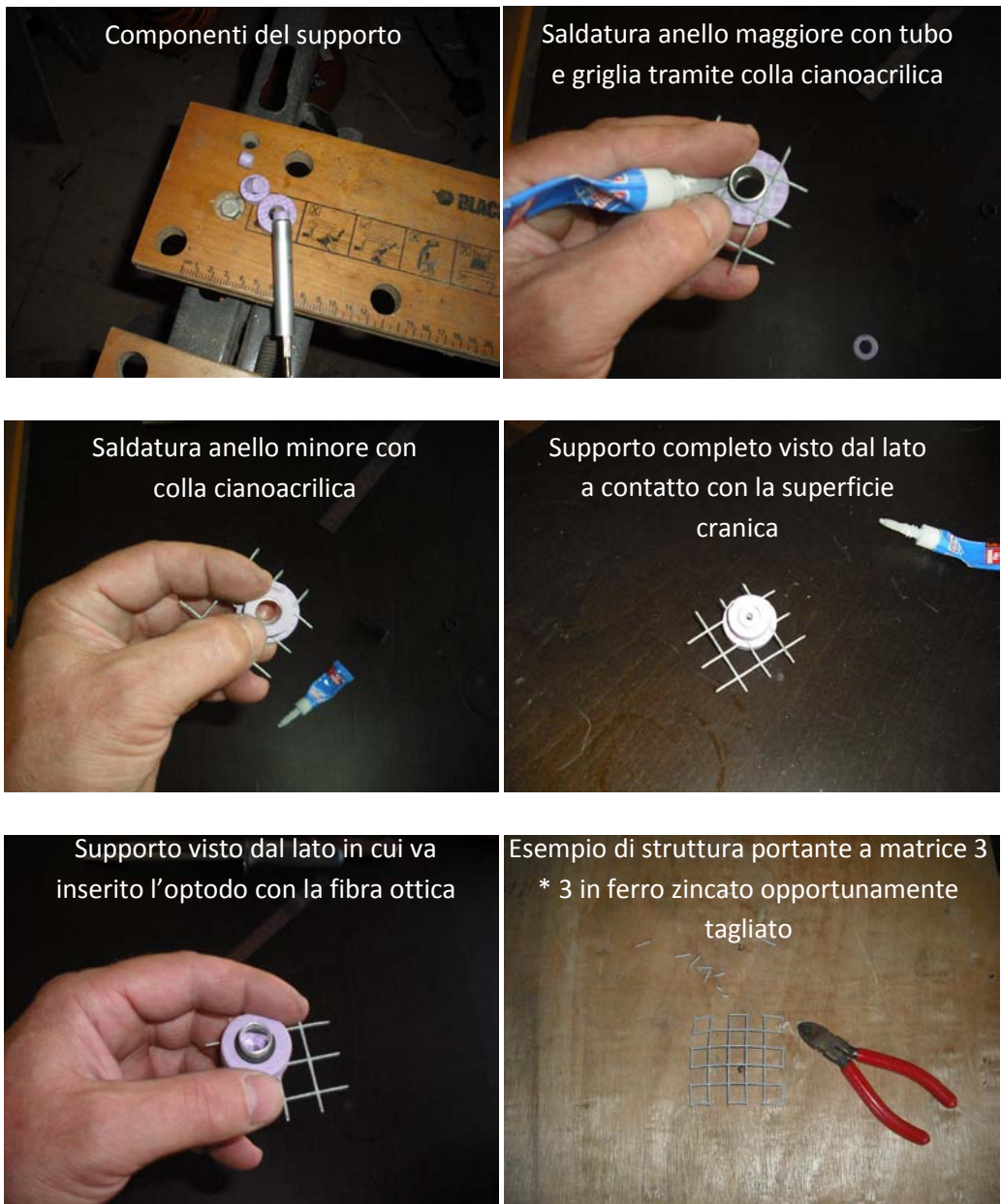
Come si può notare dalla figura, ogni optodo può assumere una direzione diversa, indipendentemente dalla direzione degli altri. Ciò garantisce l'aderenza di tutti gli optodi anche in soggetti con leggera deformazione cranica conseguente al parto.

### **7.3.1 Realizzazione della cuffia deformabile: tecnica di lavorazione**

Per la tecnica di lavorazione, sono state inserite alcune immagini che descrivono la sequenza con cui tutti i componenti della cuffietta vengono preparati per poi essere assemblati (sequenza 12, 7.3.1).







Sequenza 12 (strumenti e tecnica di realizzazione della cuffia deformabile)

## Capitolo 8

### Progettazione e realizzazione del software per rilevare i punti di repere e agevolare il corretto posizionamento della cuffietta sulla testina del neonato

#### 8.1 Il Sistema Internazionale 10-20

Per effettuare la registrazione di un EEG (Elettroencefalogramma) molti elettrodi vengono posizionati sulla superficie del cranio. Per consentire il paragone di misure successive nello stesso soggetto, o il paragone di misure in soggetti diversi, alla fine degli anni '40 è stato sviluppato un "sistema universale", conosciuto come il sistema internazionale 10-20. Questo sistema descrive l'esatta posizione di ogni elettrodo, consentendo una buona copertura di tutta la superficie encefalica e garantendo che gli elettrodi siano sempre posizionati sopra le stesse aree (anche se la certezza assoluta può solo essere ottenuta sovrapponendo una risonanza magnetica). Vengono misurate delle linee, utilizzando come punto di partenza precise localizzazioni anatomiche. Queste linee disegnano una rete sulla superficie del cranio, ai cui punti di intersezione sono posizionati gli elettrodi. La distanza tra un elettrodo e l'altro è sempre il 10 o il 20% della lunghezza totale della linea, da cui il nome del sistema. I punti di riferimento per la misura percentuale sono il punto preauricolare il nasion e l'inion (vedi figura 1, 8.1)

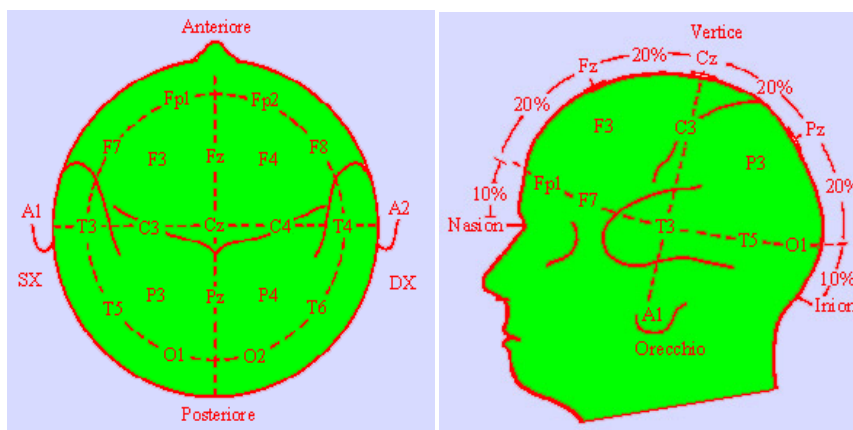


Figura 1 (posizionamento degli elettrodi in base al Sistema Internazionale 10-20)

Ogni posizione di un elettrodo viene denominata usando una lettera e un numero (o talora una seconda lettera). La lettera prende nome dal lobo cerebrale sottostante (Fp = frontopolare, F = frontale, T = temporale, P = parietale e O = occipitale), tranne che per gli elettrodi C (centrali). Il numero è pari (2, 4, 6, 8) per il lato destro e dispari (1, 3, 5, 7) per il sinistro, con i valori più bassi

in posizione mediale. La posizione sulla linea mediana interemisferica è indicata con la lettera z. (<http://www.personalweb.unito.it/fabrizio.benedetti/esercitazioni/fisiologia/areadidattica/Esercitazione6/sistemainternazionale1020.html#>).

### 8.1.1 Fasi per la determinazione degli elettrodi nel sistema internazionale 10-20

I tre punti di riferimento sul cranio sono:

- Il nasion: il ponte nasale
- L'inion: la protuberanza ossea centrale dell'osso occipitale
- Il punto preauricolare: la depressione ossea immediatamente davanti al trago

Si inizia con la misura della distanza tra nasion e inion seguendo la linea mediana dell'encefalo. Il punto frontopolare Fp viene localizzato al 10% di questa distanza, sopra il nasion. A partire da questo punto, a intervalli del 20% della distanza tra nasion e inion, procedendo verso l'inion, si localizzano i punti Fz, Cz, Pz e O (figura 2, 8.1.1).

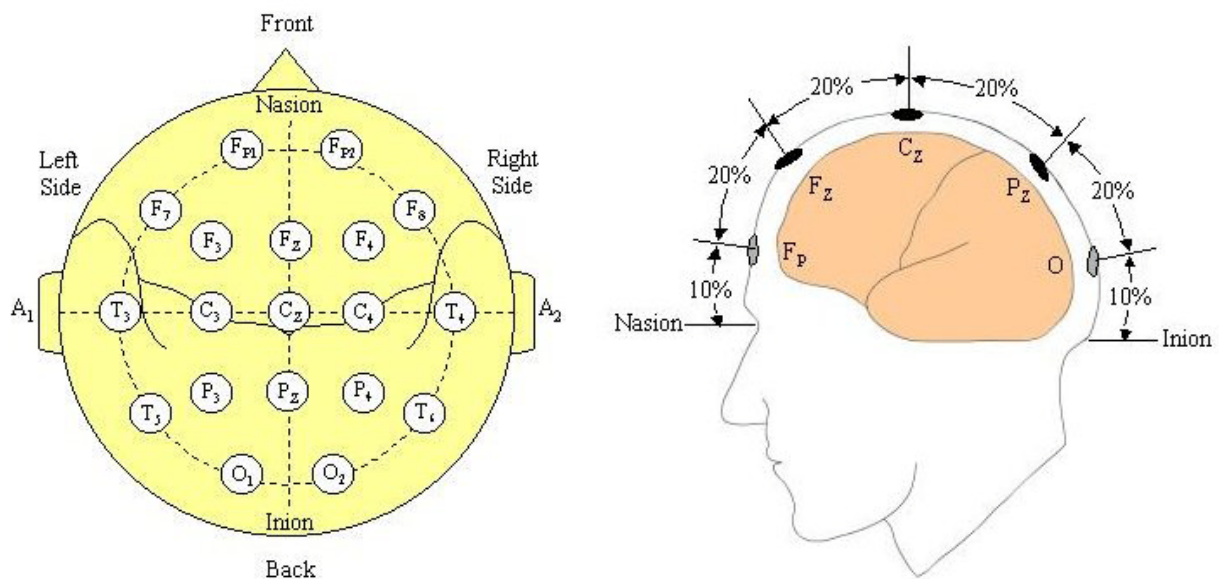


Figura 2 (metodo per la localizzazione dei punti in base al Sistema Internazionale 10-20)

Successivamente si misura la distanza tra i 2 punti preauricolari, passando per Cz. Si localizzano così C3 e T3 a sinistra e C4 e T4 a destra, allontanandosi da Cz di una distanza pari al 20 e al 40% della distanza totale, rispettivamente (figura 3, 8.1.1)



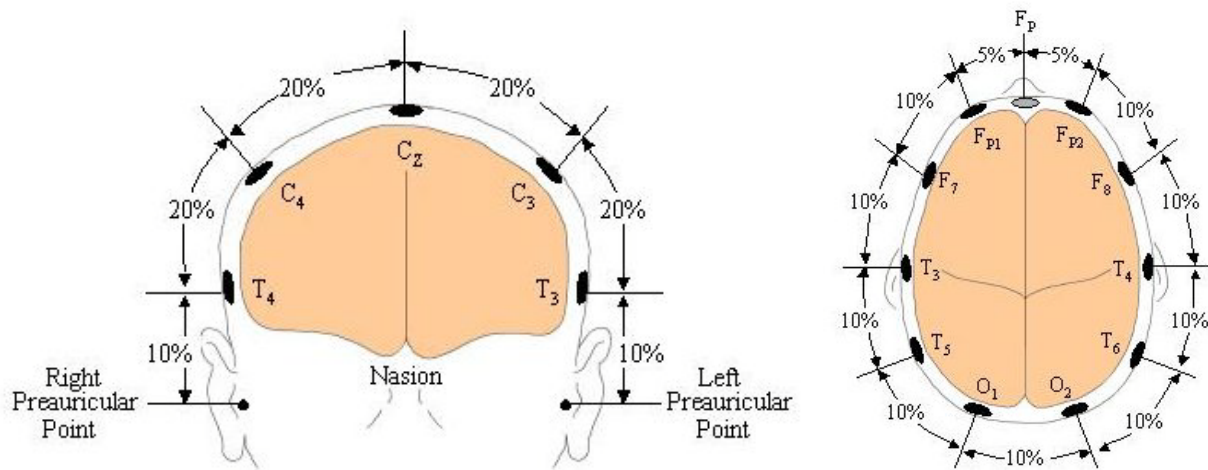


Figura 3 (suddivisione del cranio in percentuali)

La terza misura è quella della circonferenza cranica, passante per i punti Fp, O, T3 e T4. Si localizza poi il punto Fp1 a una distanza del 5% del totale, a sinistra di Fp; quindi in successione F7, T3, T5, O1, O2, T6, T4, F8 e Fp2, distanziati tra loro di un ulteriore 10% ogni volta. A questo punto si localizzano: F3, all'incrocio delle linee congiungenti Fp1-C3 e Fz-F7; F4 all'incrocio delle linee congiungenti Fp2-C4 e Fz-F8. P3, all'incrocio delle linee congiungenti C3-O1 e Pz-T5; P4 all'incrocio delle linee congiungenti C4-O2 e Pz-T6. I 19 punti di localizzazione degli elettrodi sono così tutti identificati.

(<http://www.personalweb.unito.it/fabrizio.benedetti/esercitazioni/fisiologia/areadidattica/Esercitazione6/dettaglio1020.html>).

## 8.2 Progettazione del software

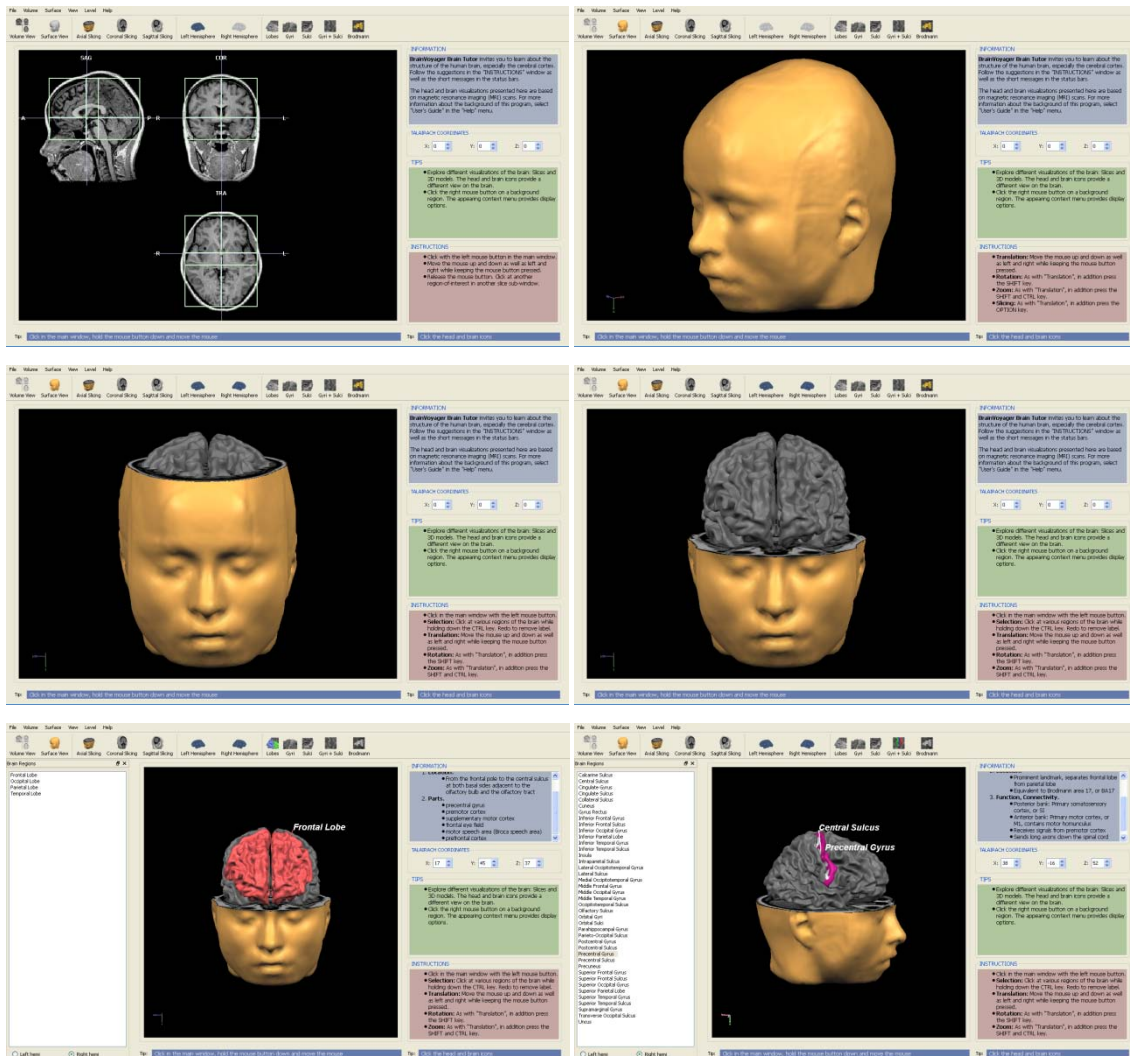
Il sistema 10 – 20 è un sistema universale per la collocazione degli elettrodi durante la registrazione EEG. E' possibile utilizzarlo anche per il corretto posizionamento dei probe sulla testina del bambino, in base alle aree corticali indagate?

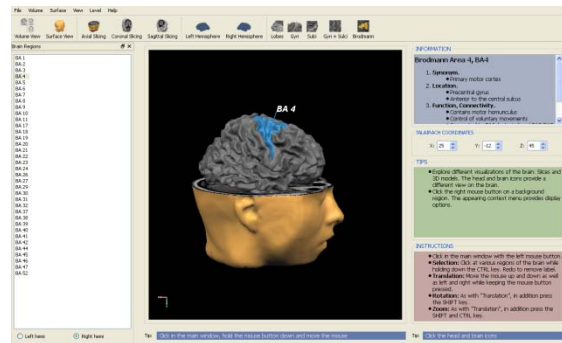
Bisognava realizzare un sistema che potesse essere utilizzato come “modello” di rappresentazione universale per collocare le cuffiette del Nirs sulla testina dei neonati, sfruttando il sistema di riferimento 10-20.



## 8.2.1 Introduzione

Innanzitutto è stata fatta una ricerca in internet per recuperare tutte le informazioni sugli eventuali programmi che potessero aiutarci allo scopo. Poi è stato scaricato gratuitamente ed installato il programma BrainVoyager Brain Tutor (<http://www.brainvoyager.com/>). Questo programma è molto utile per apprendere facilmente la struttura cerebrale e in particolare la corteccia, con la possibilità di evidenziare giri, solchi e aree di Brodmann con la relativa localizzazione e funzione. Nel software è visualizzato tridimensionalmente il “modello” di una testa di adulto,ricostruito in 3D dalle immagini ricavate da MRI (Immagine a Risonanza Magnetica). La testa può essere ruotata e visualizzata in tutte le prospettive possibili. Ogni prospettiva può essere salvata ed utilizzata come immagine bidimensionale (sequenza 4, 8.2.1).





Sequenza 4 (esempi di prospettive della testa e del cranio, costruite tramite BrainVoyager Brain Tutor)

## 8.2.2 Pianificazione del progetto

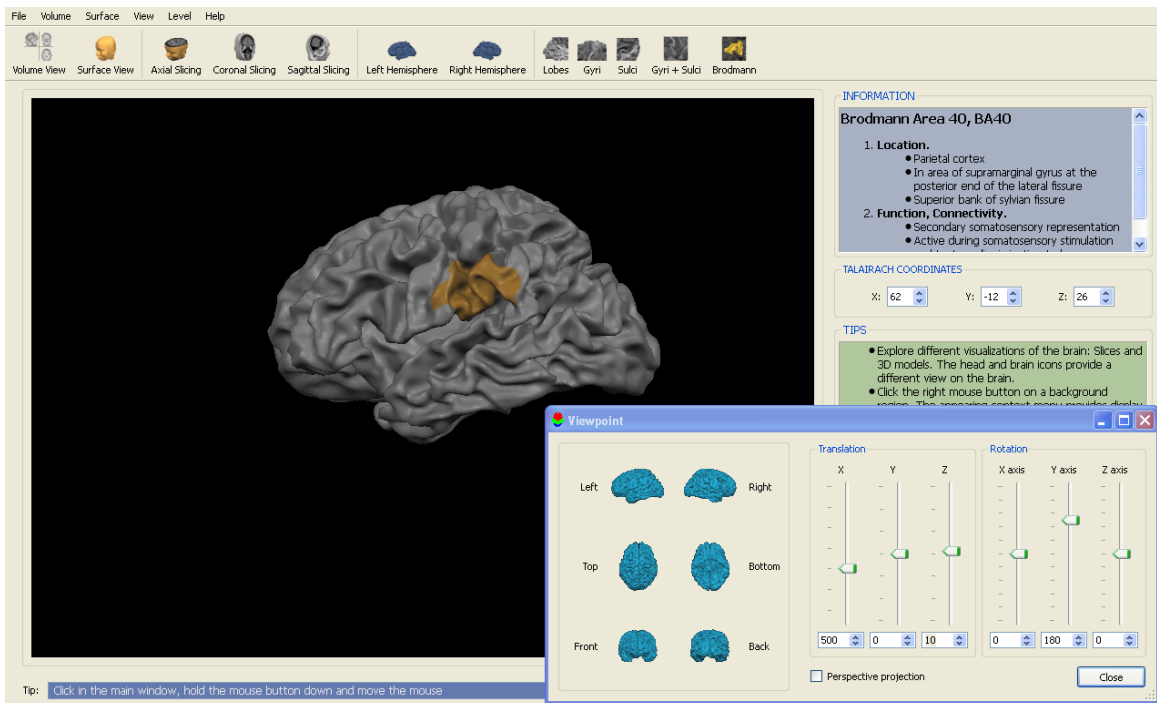
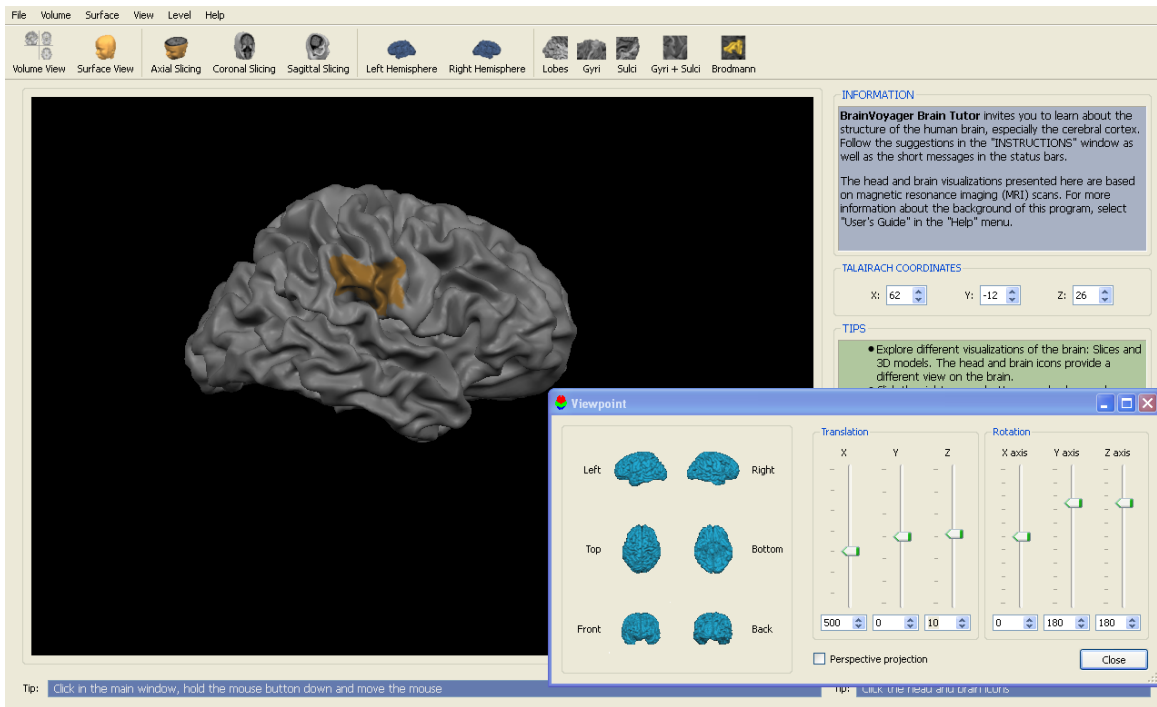
Il progetto era focalizzato al tentativo di realizzare un software che potesse sfruttare le immagini prospettiche ricavate da BrainVoyager Brain Tutor per ricostruire, sulle varie prospettive, il sistema di riferimento 10-20 con tutte le distanze tra i vari punti proporzionalmente alla dimensione soggettiva di ogni singola testina del neonato.

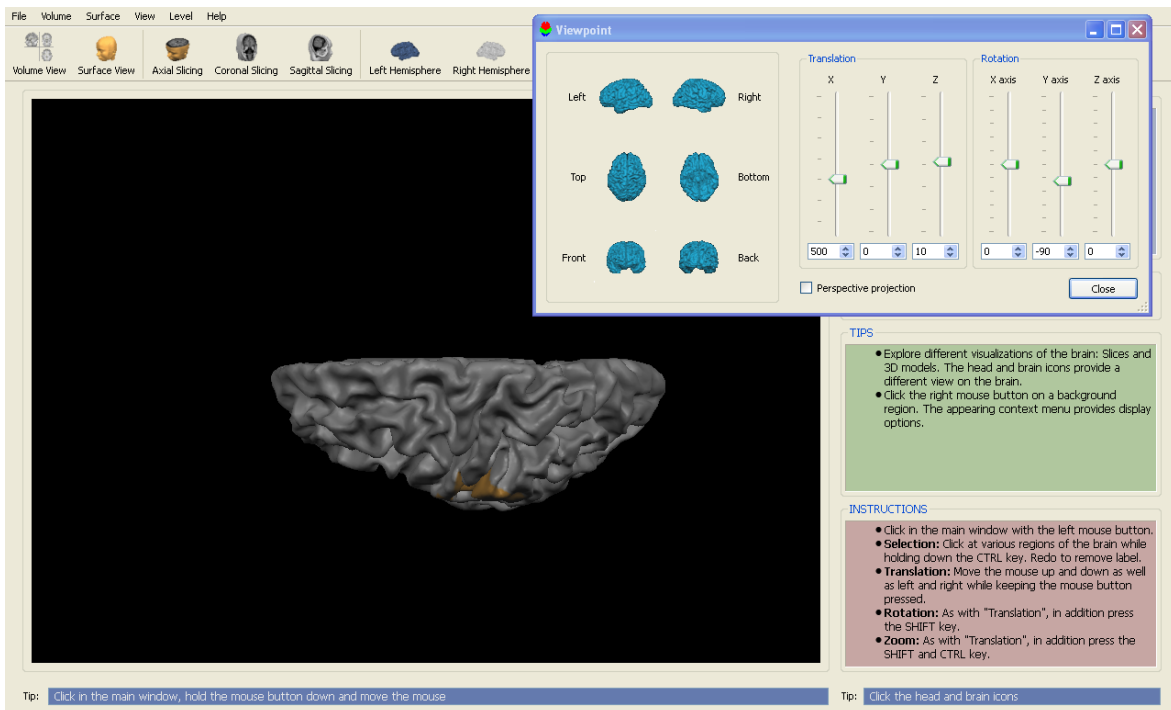
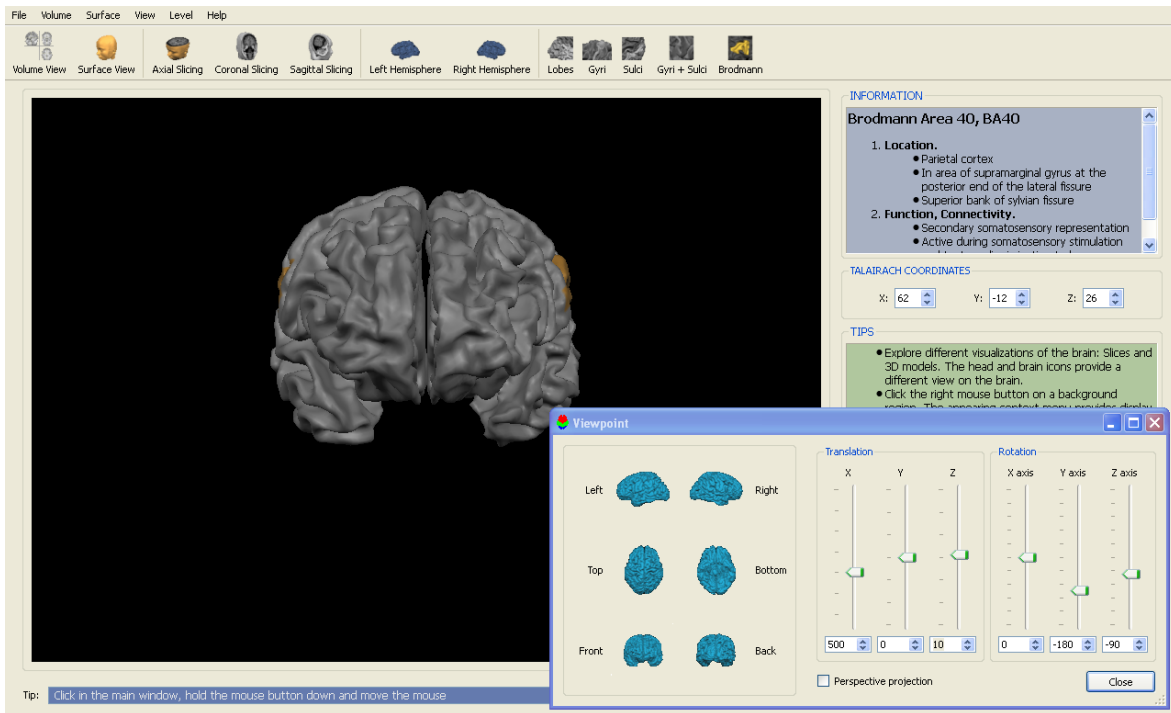
Dal progetto è stato sviluppato il programma **S.T.B.M. (System 10-20 Topographic Brain Mapping)** scritto con il linguaggio di programmazione Labview 7.1 di National Instruments.

## 8.3 S.T.B.M. (System 10-20 Topographic Brain Mapping ver. n. 8)

Supponendo si sia interessati ad esplorare con il Nirs, una superficie cerebrale corrispondente all'area di Brodmann 40, nella corteccia parietale, attiva durante la stimolazione somatosensoriale, si può selezionare tale area con BrainVoyager Brain Tutor, e rispettando i parametri della finestra viewpoint, mostrata di seguito, salvare tale prospettiva in formato png.

Insieme alla prospettiva laterale di un emisfero, si può salvare come immagine anche quella complementare, quella frontale, posteriore, inferiore e superiore (sequenza5, 8.3).

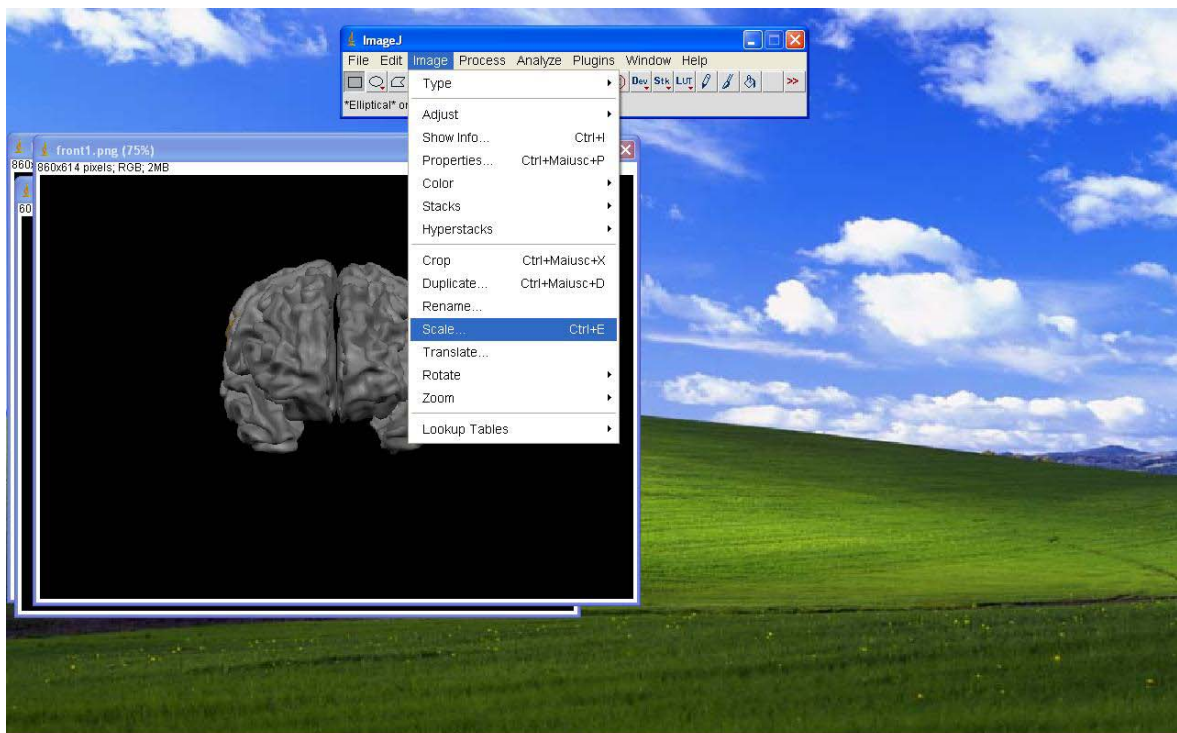
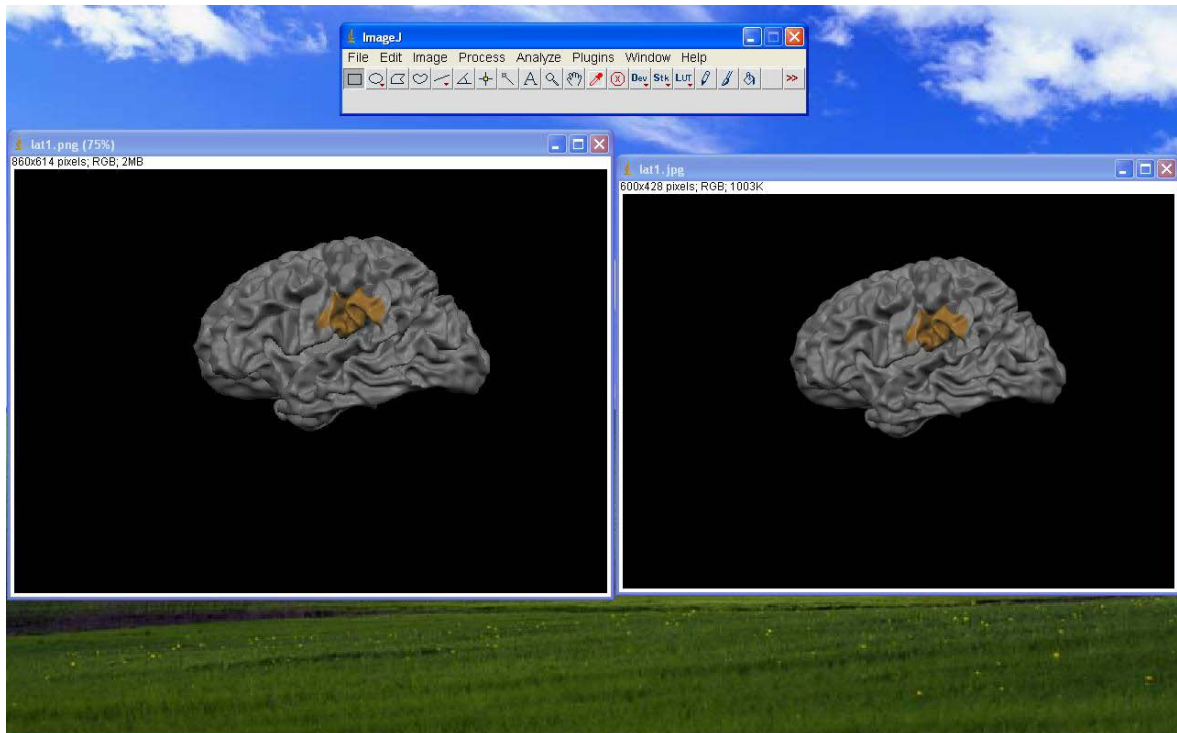




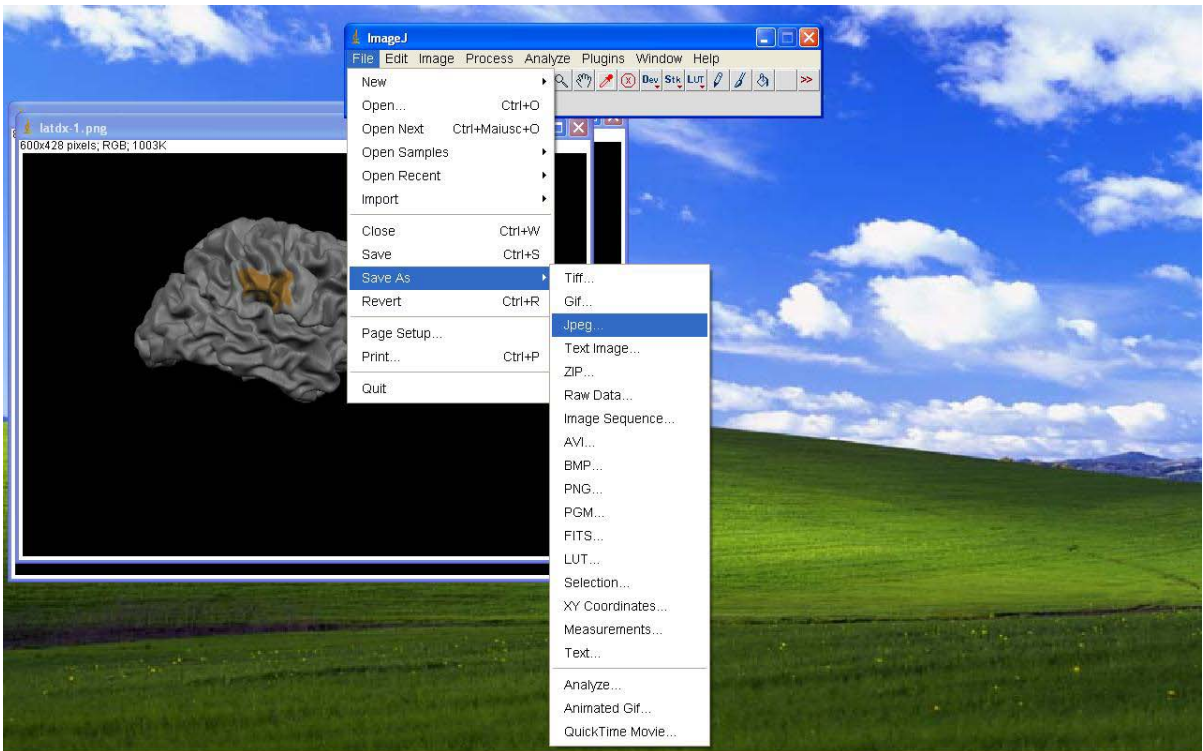
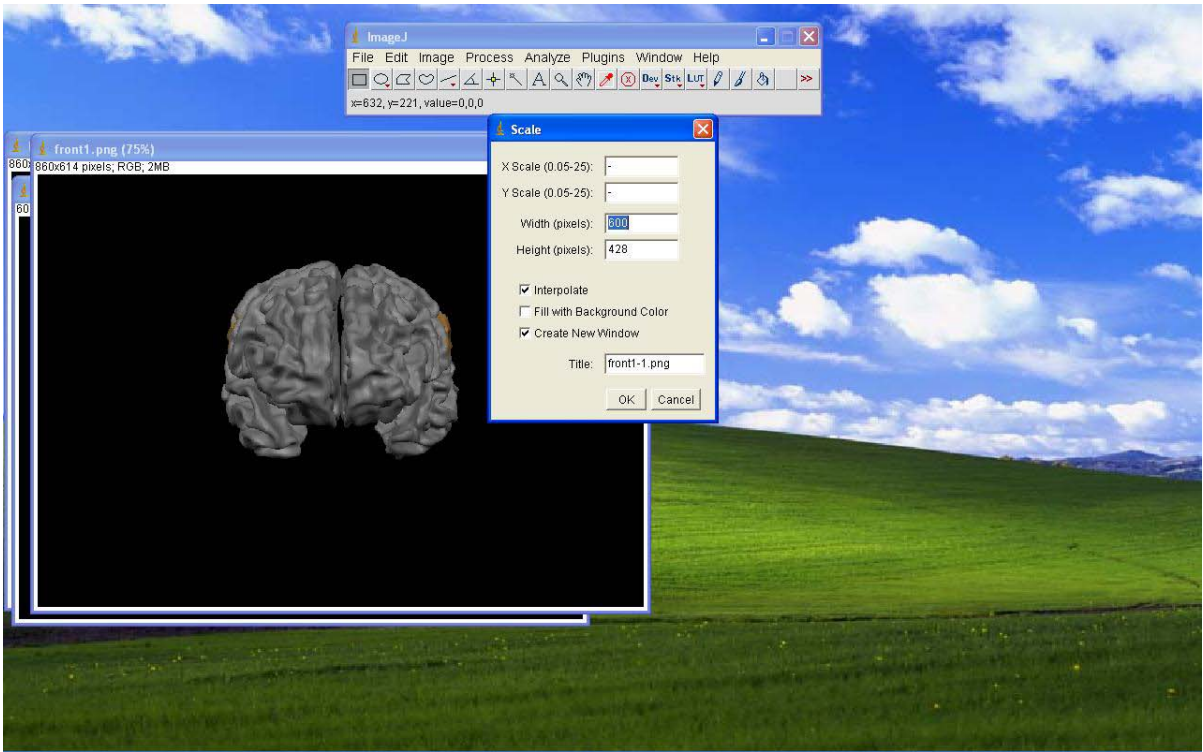
Sequenza5 (estrapolazione delle prospettive cerebrali realizzate tramite BrainVoyager Brain Tutor)

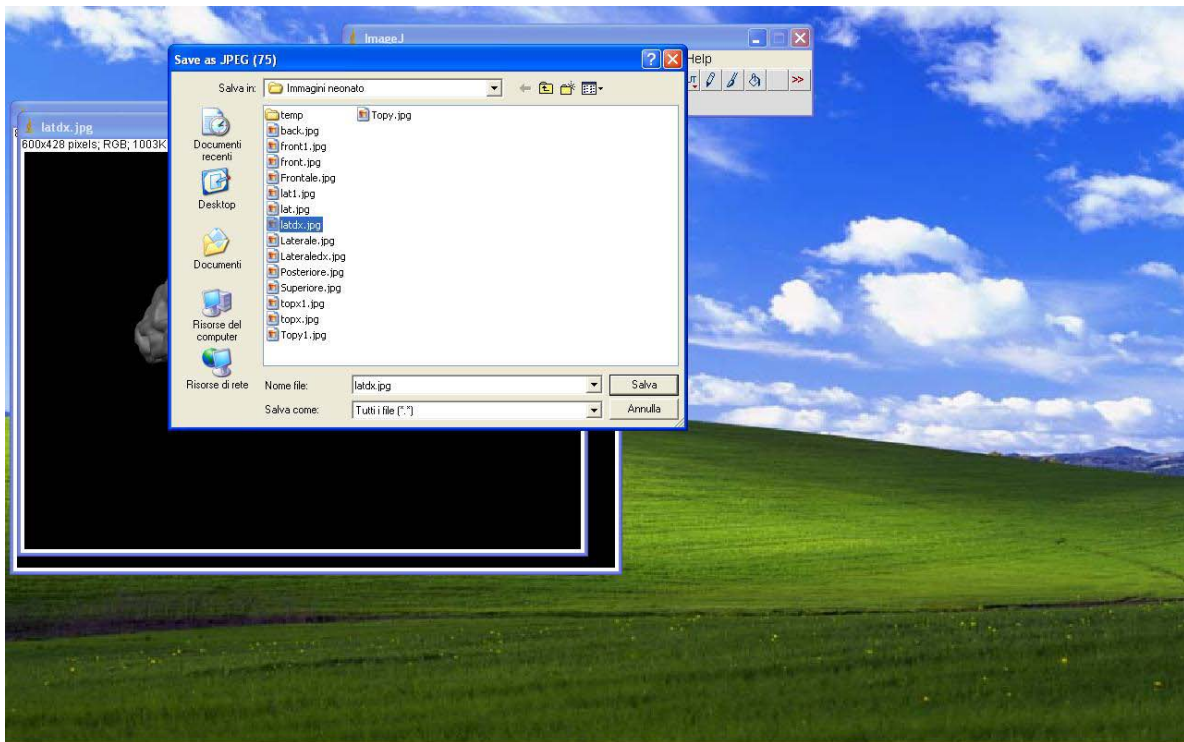
Dato che BrainVoyager, salva le immagini con risoluzione 860 X 614 in formato PNG, tramite un qualsiasi programma di fotoritocco, quale ad esempio ImageJ, scaricabile gratuitamente

dalla rete, è possibile modificarle abbassando la risoluzione a 600 X 438 e salvandole, in una opportuna cartella di lavoro, con i nomi utilizzati di default dal programma STBM (lat1.jpg, front1.jpg, topx1.jpg, dx.jpg, latsx e back.jpg). (sequenza 6, 8.3).







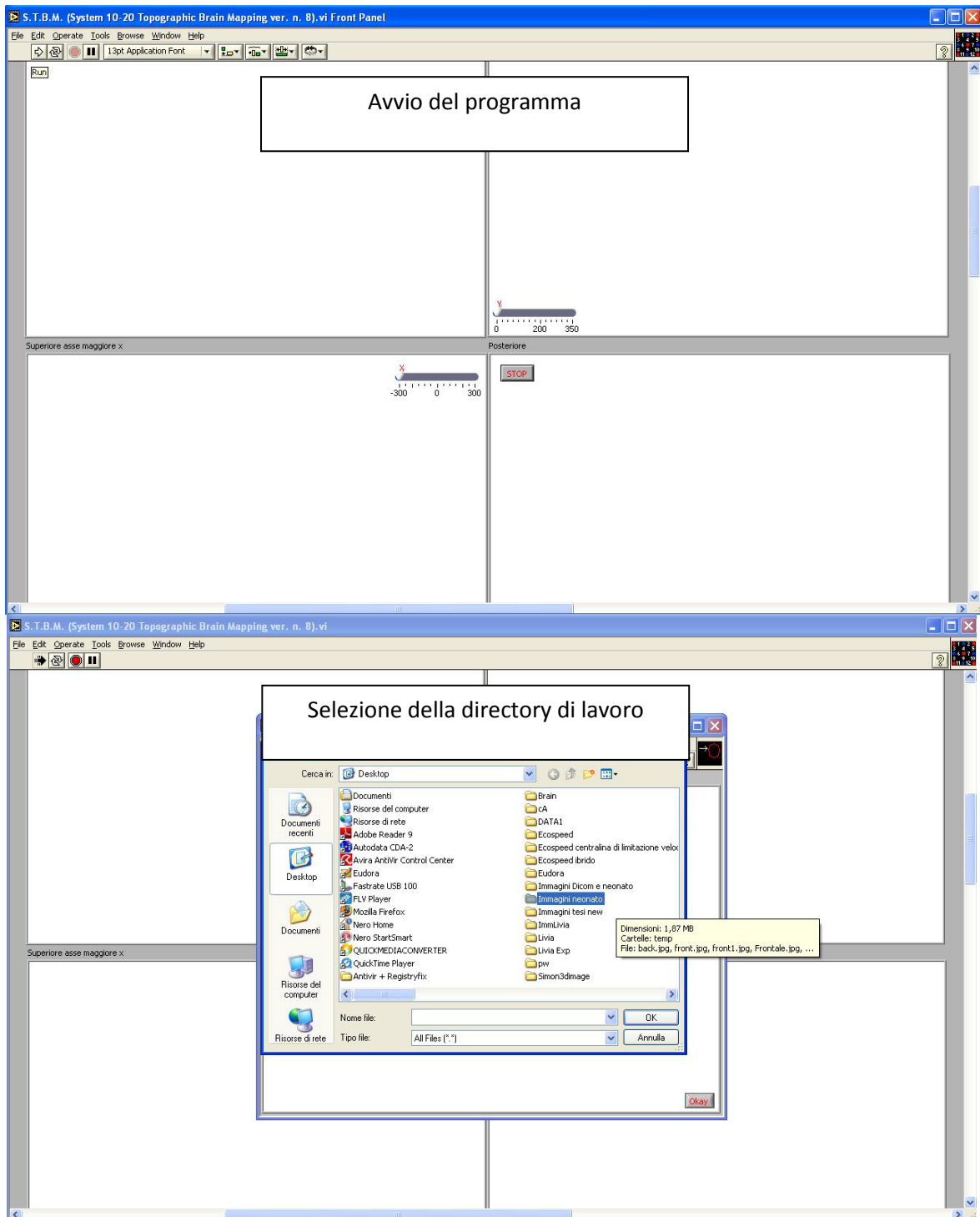


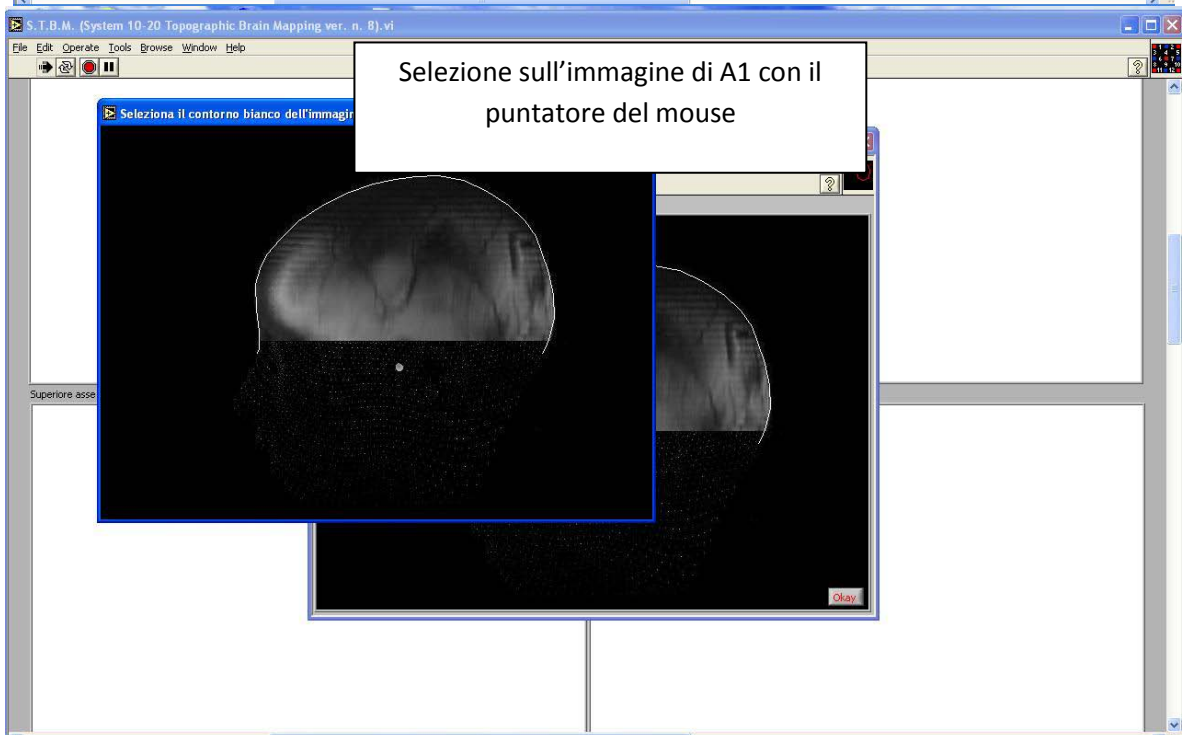
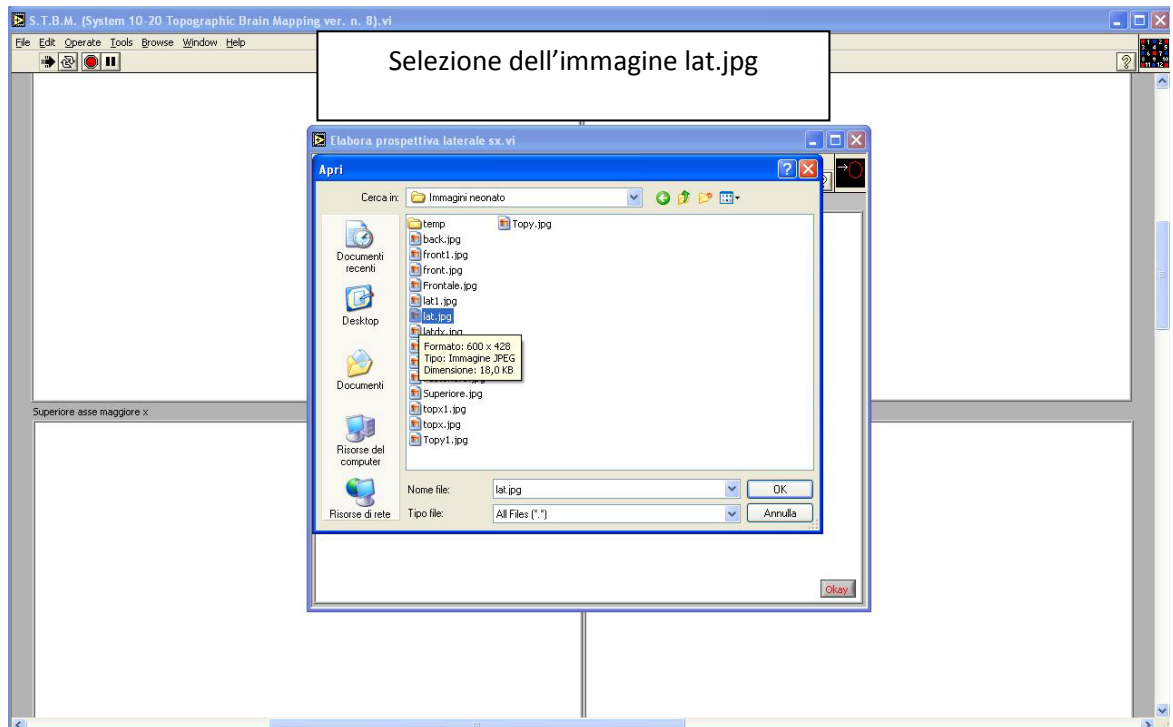
Sequenza 6 (salvataggio delle prospettive cerebrali in formato jpg)

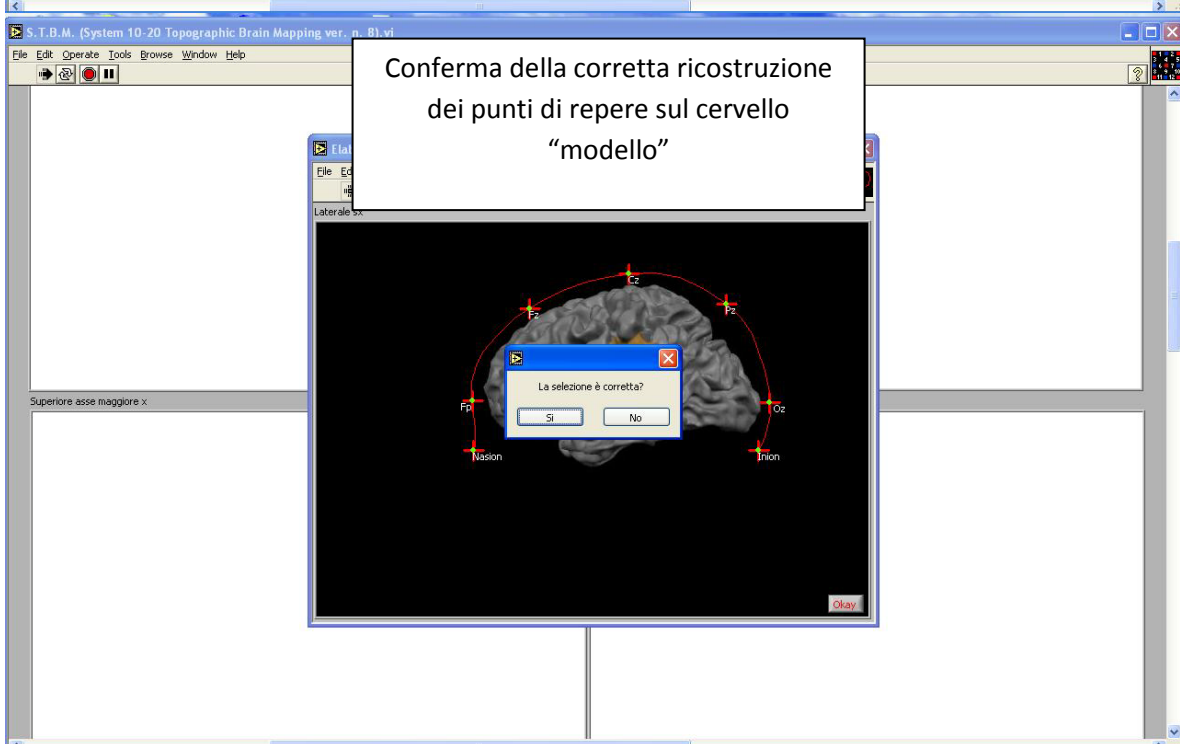
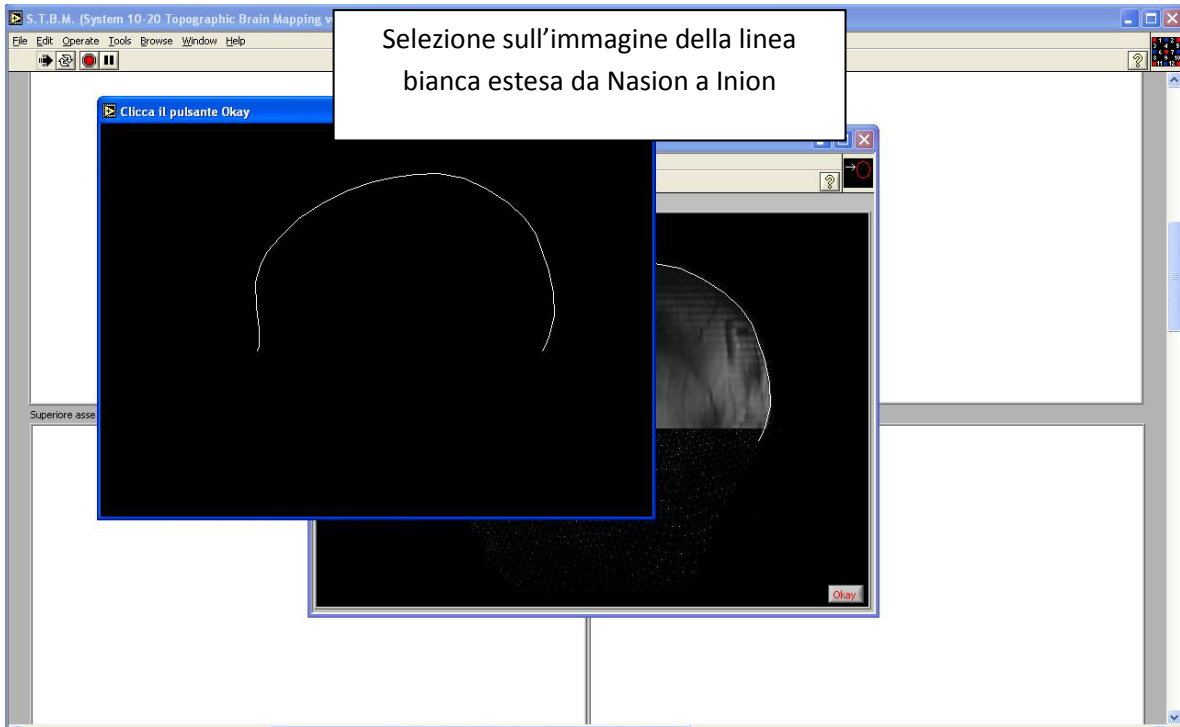
All'avvio, il programma STBM chiede di caricare le varie prospettive, su ognuna delle quali ricostruisce i punti più importanti del sistema internazionale 10-20. Il software richiede che venga inserita una o più lunghezze in mm relative alla distanza Nasion – Inion, alla distanza A1 – A2 e alla misura della circonferenza cranica. Dalle lunghezze ricava la distanza in millimetri tra tutti i punti del sistema 10-20, visualizzati sulle varie prospettive. Inserendo tutte tre le misure, il sistema è più preciso, dato che nessuna lunghezza è ignota e quindi non ci sono misure ricavate proporzionalmente dal valore di quelle note.

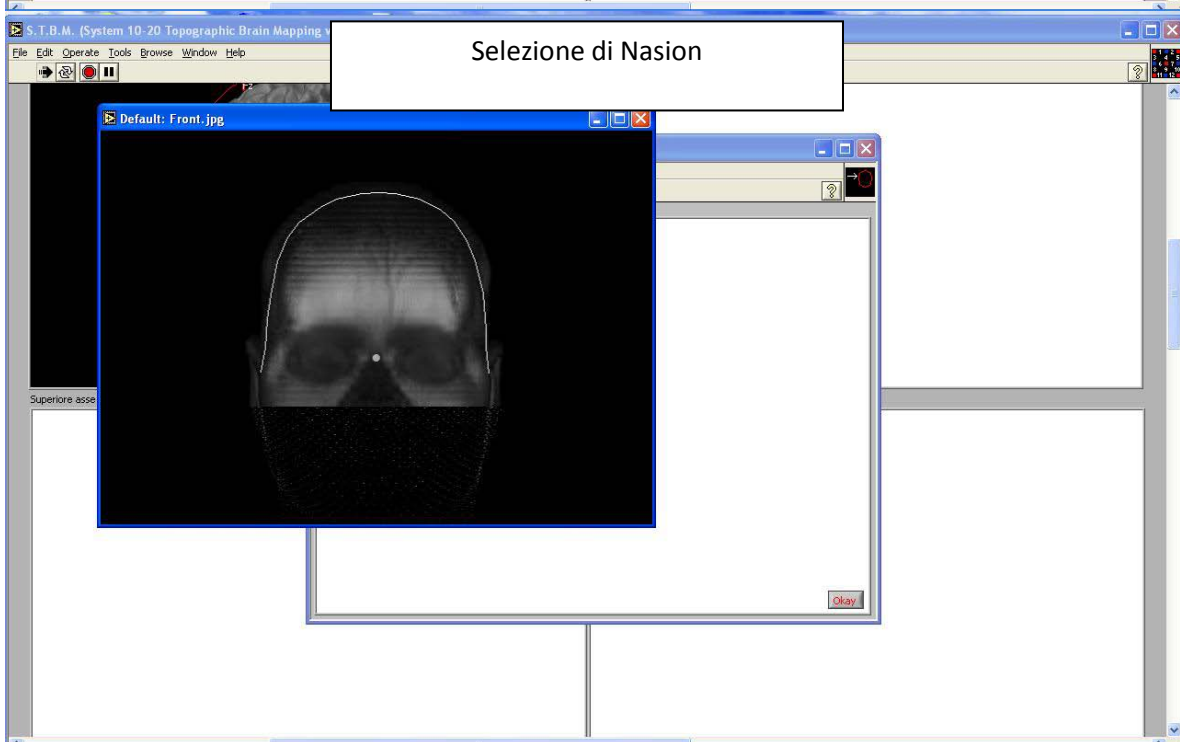
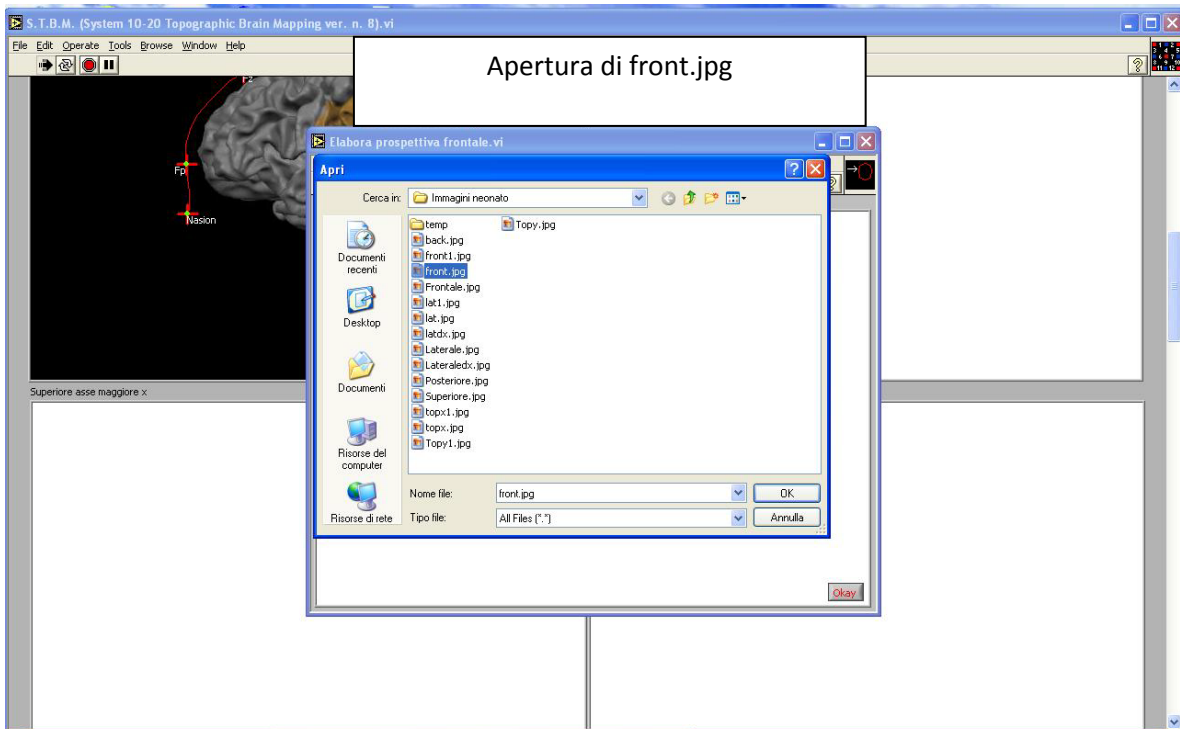
Chiede inoltre sia inserita la distanza interoptodica in mm. Muovendo poi i cursori X e Y, è possibile posizionare la rappresentazione grafica della cuffietta, al di sopra delle aree di interesse e marcare con una linea rossa, i canali che si presuppone siano significativamente coinvolti durante lo svolgimento del compito sperimentale. Tutte le prospettive, con o senza aree interoptodiche evidenziate, sono salvate come immagini jpg (**J**oint **P**hotographic **E**xperts **G**roup) con la possibilità di essere visualizzate direttamente dal programma STBM, o da un qualsiasi programma di fotoritocco (sequenza 7, 8.3).

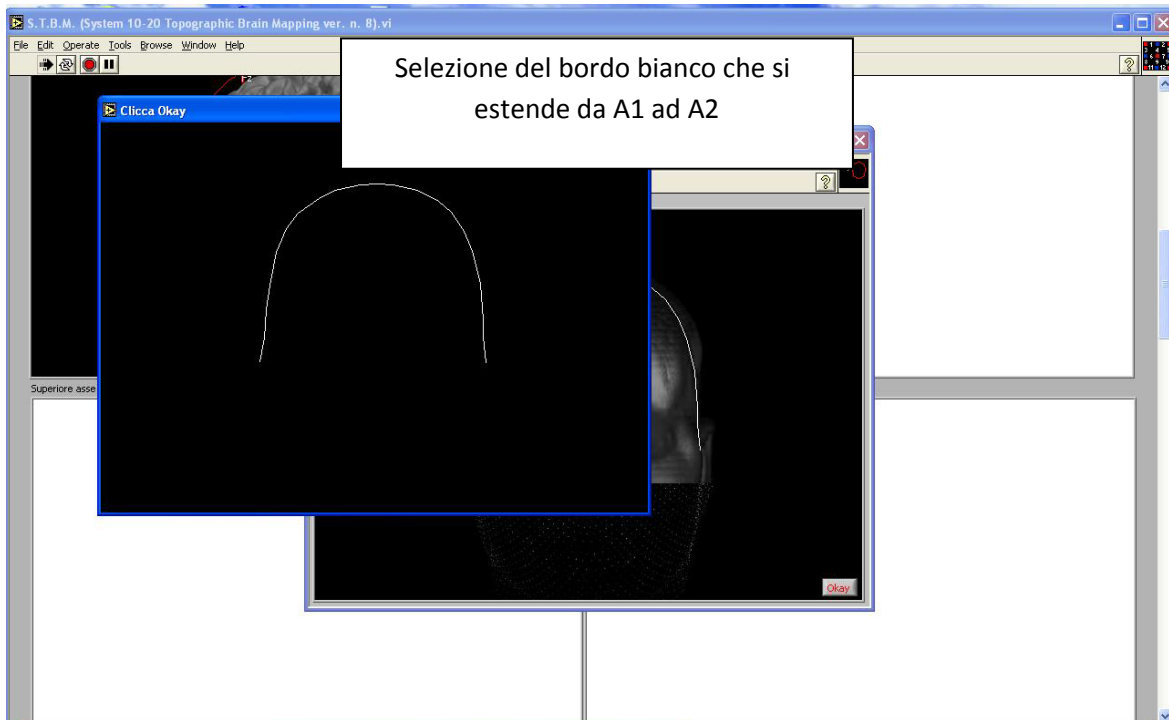


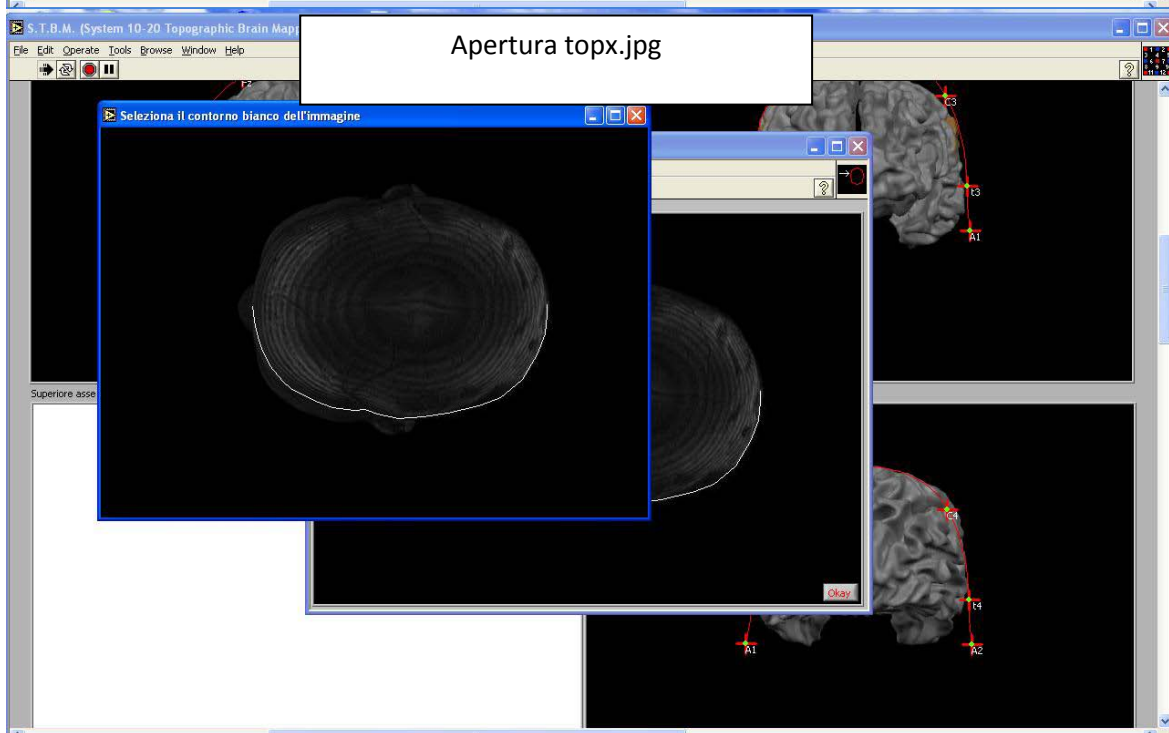
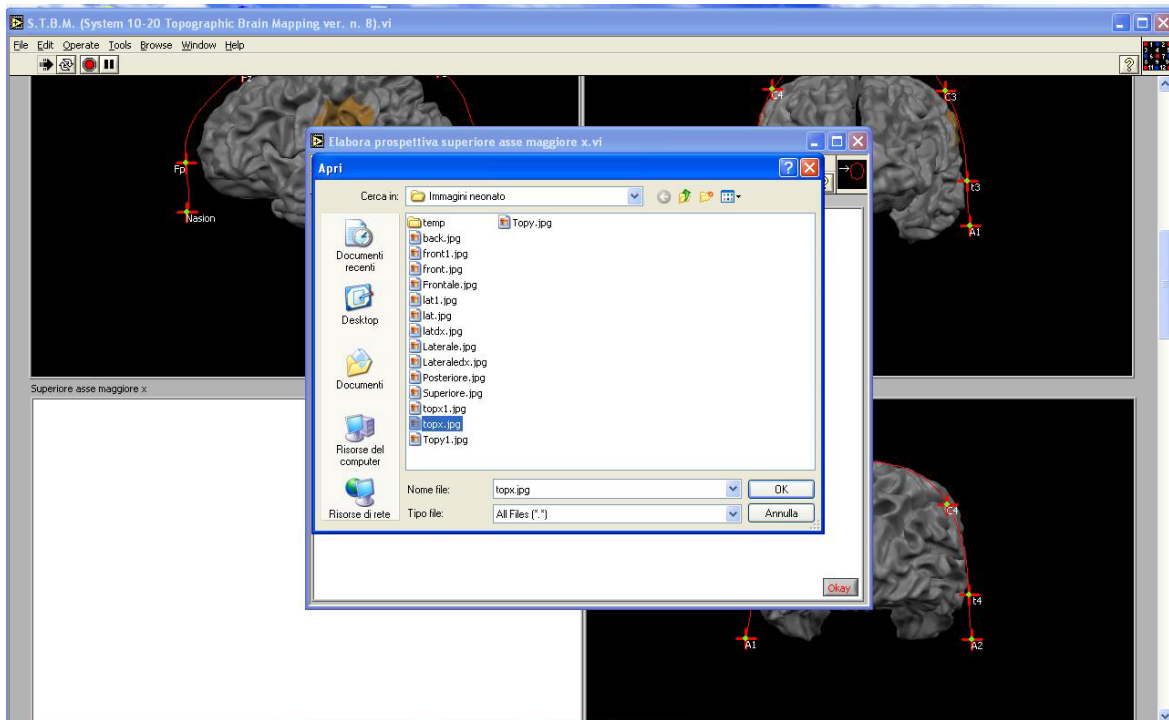


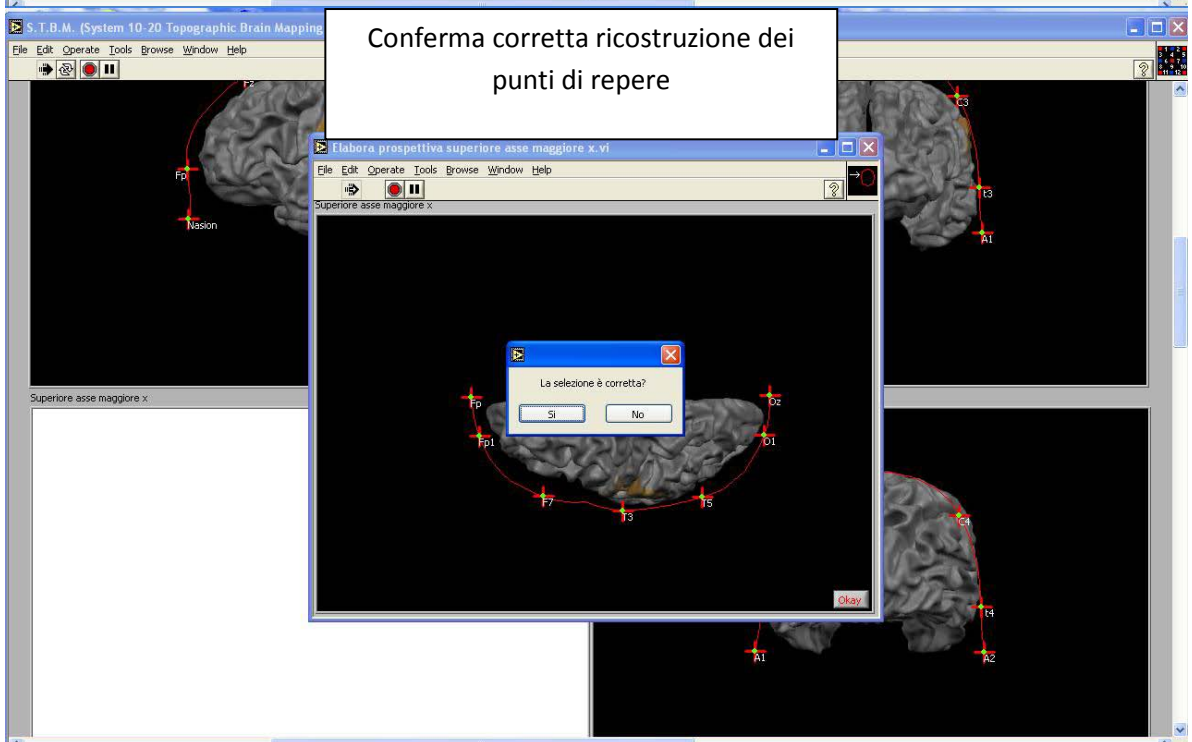
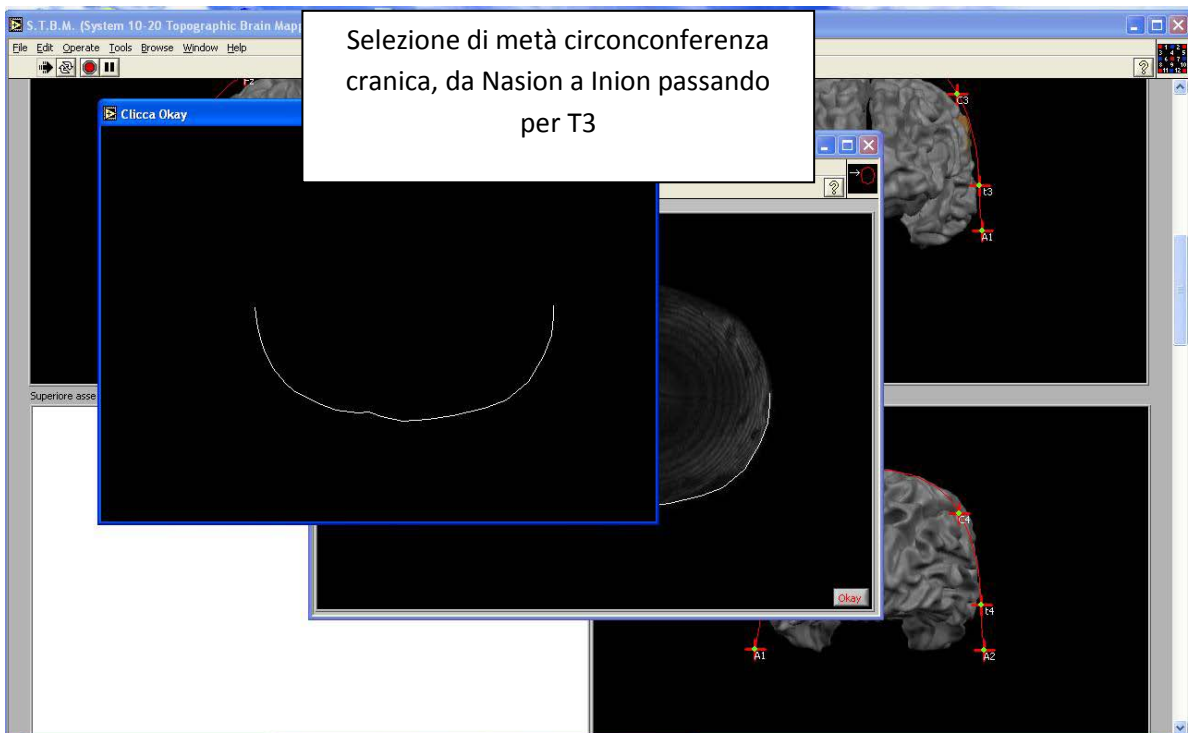




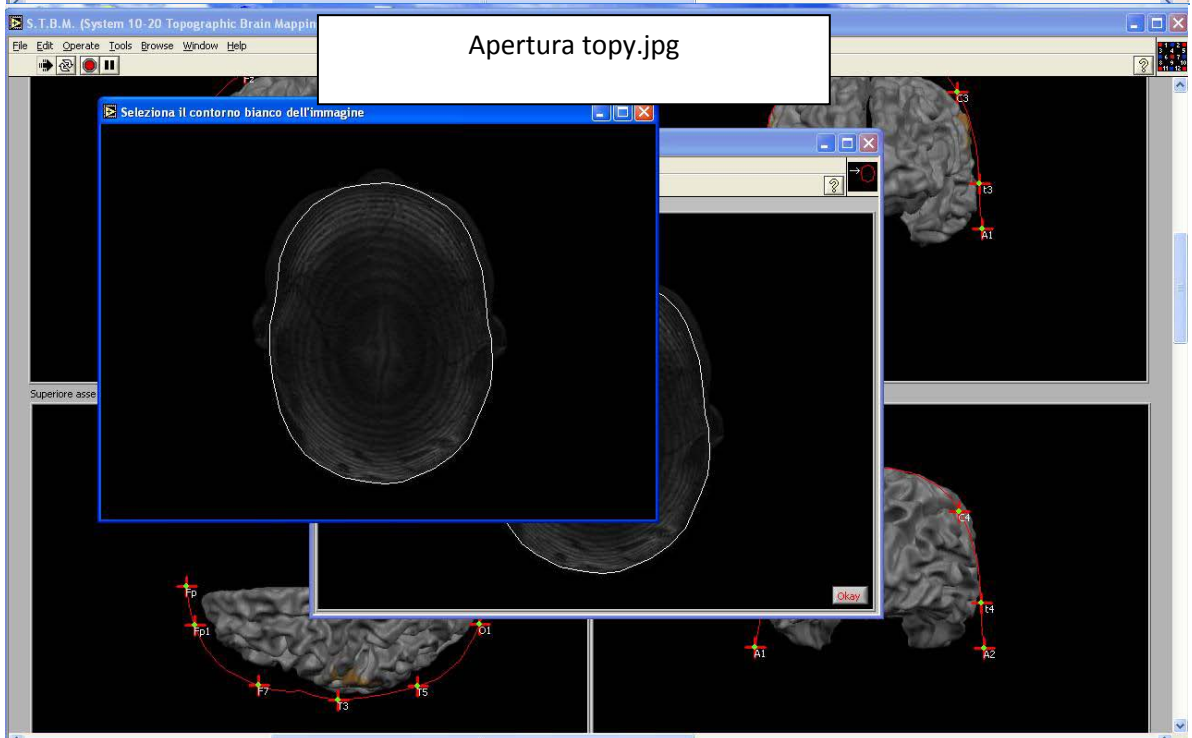
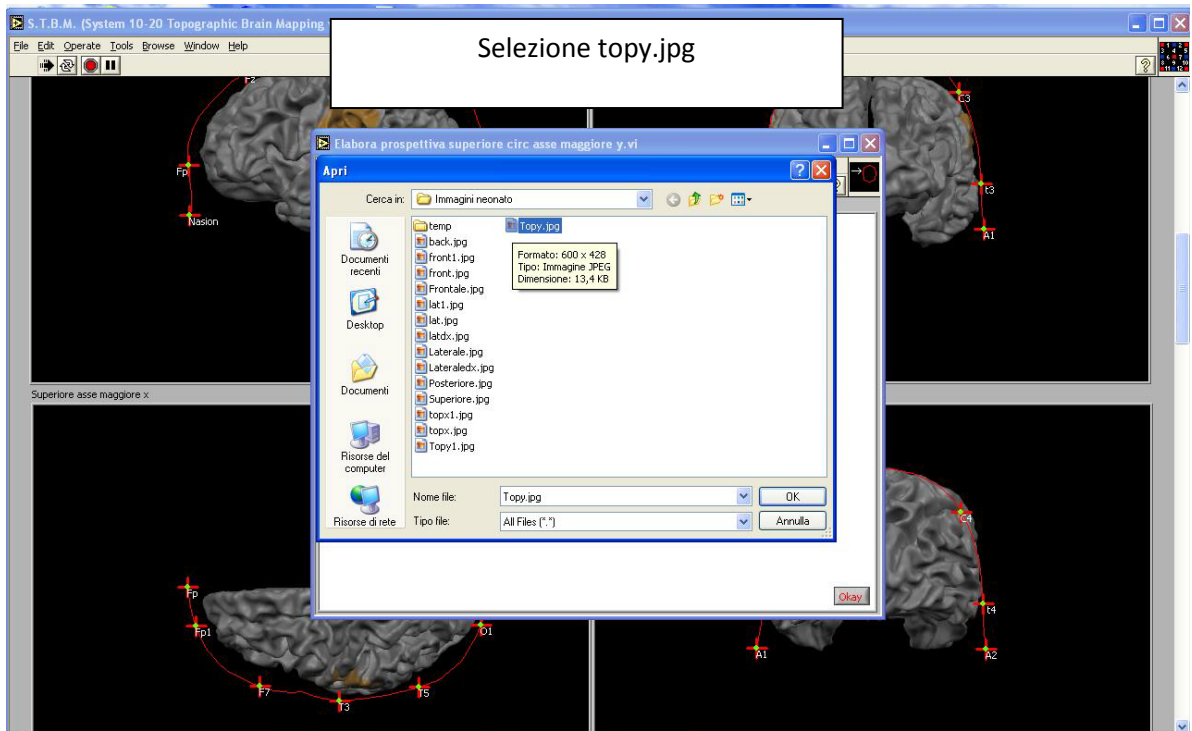


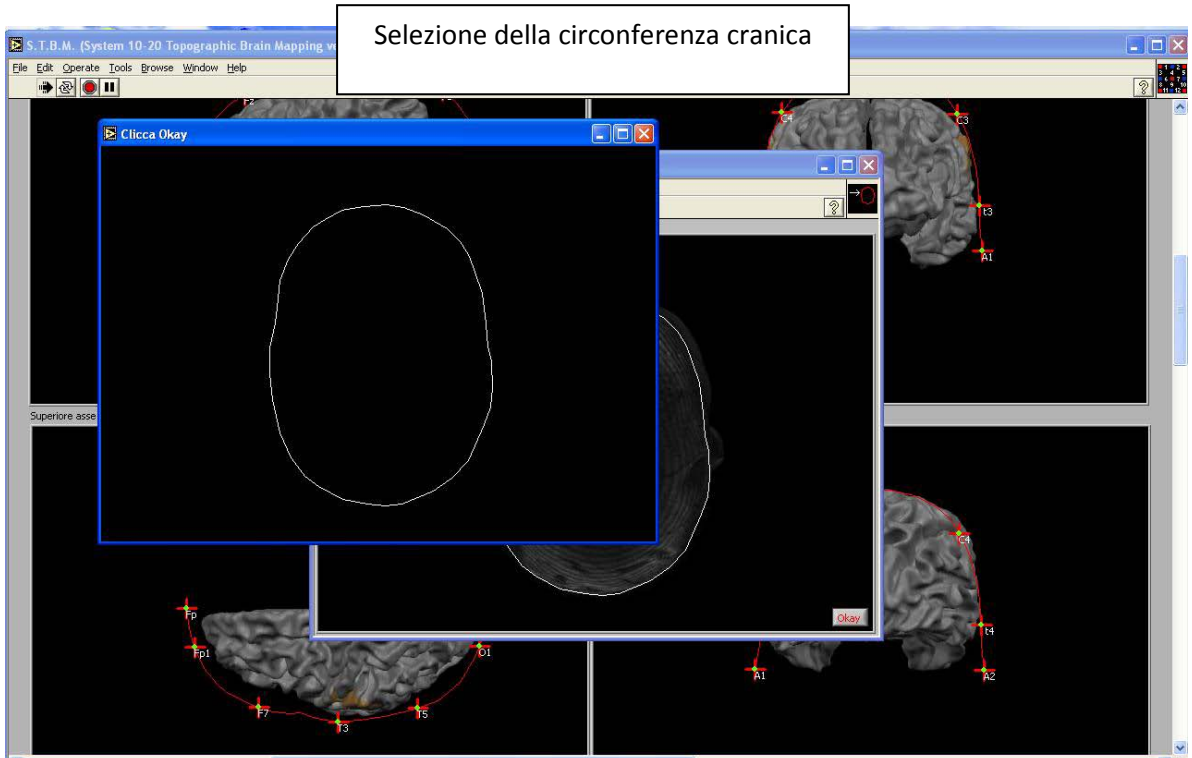


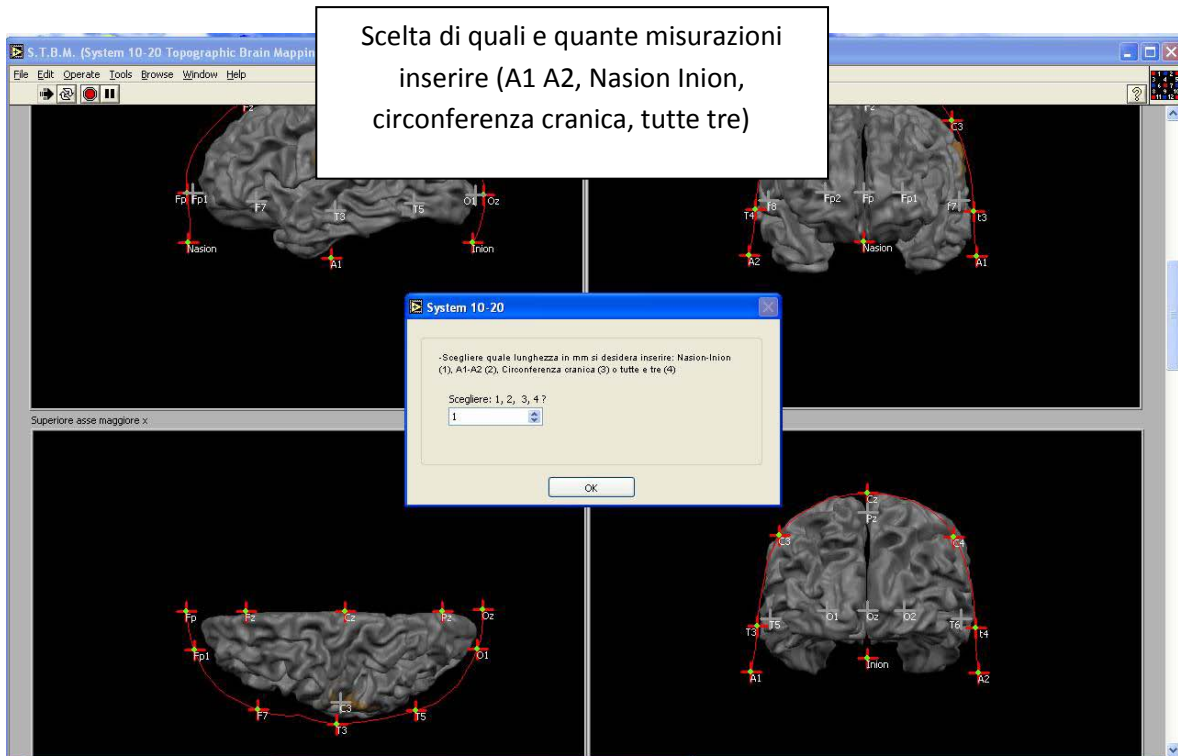


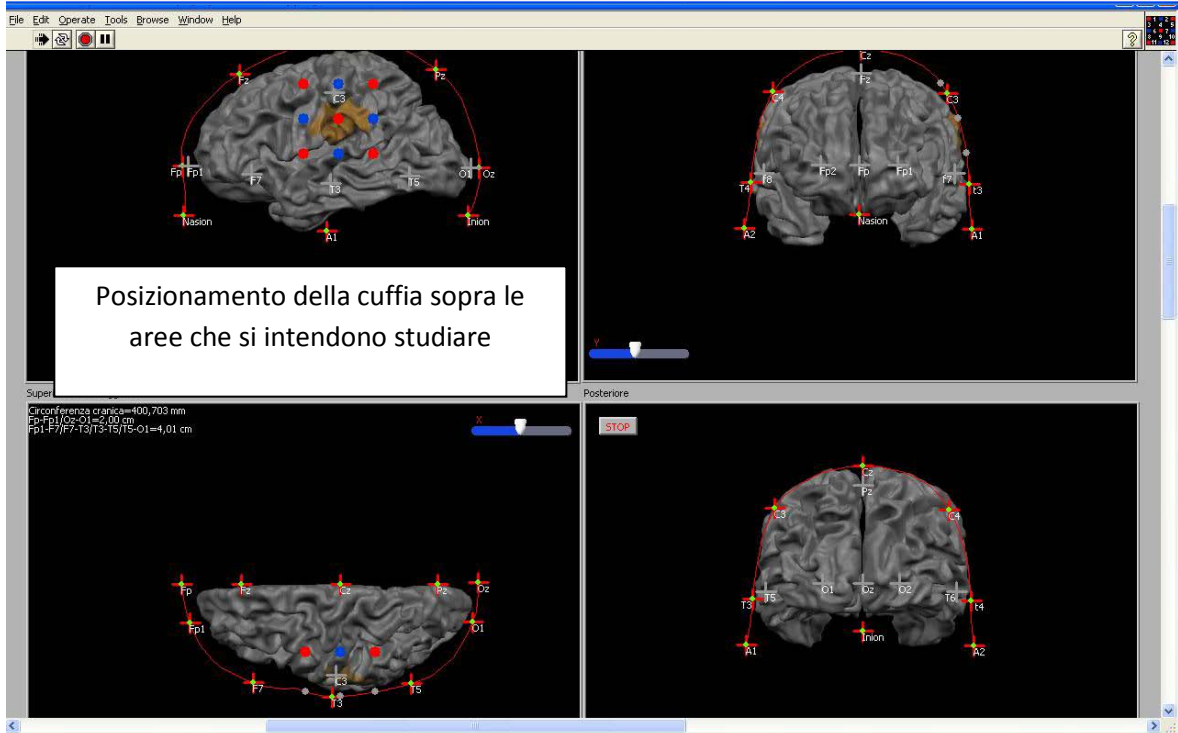
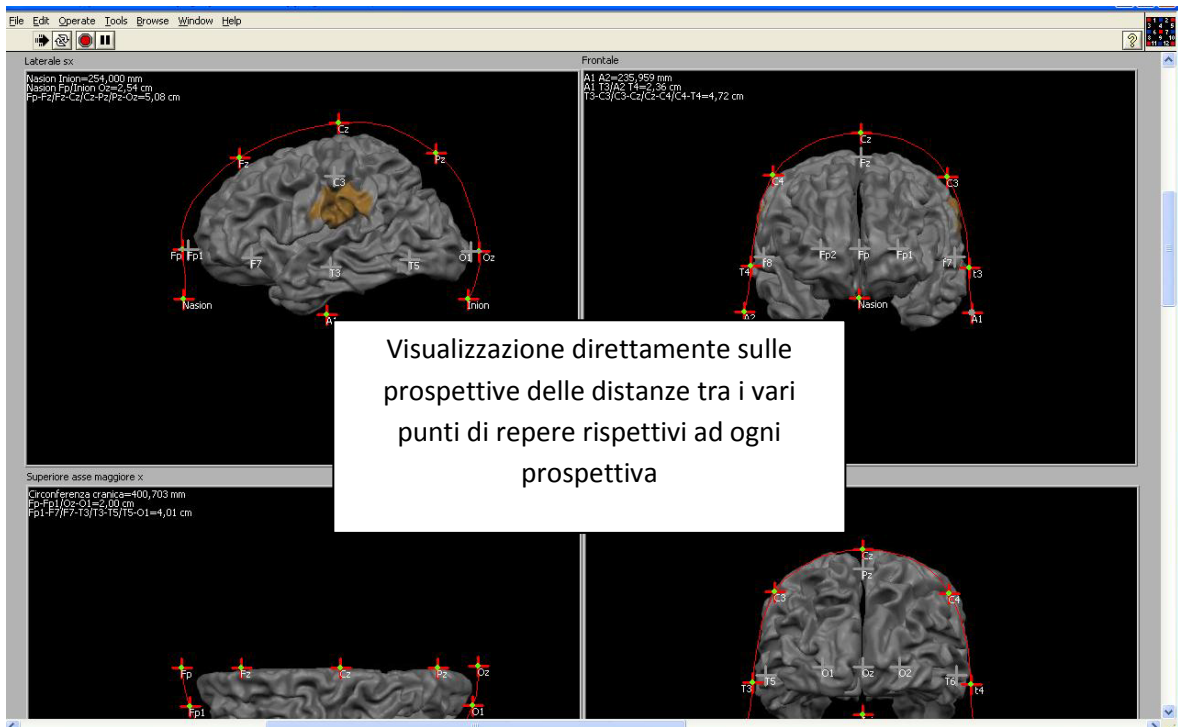


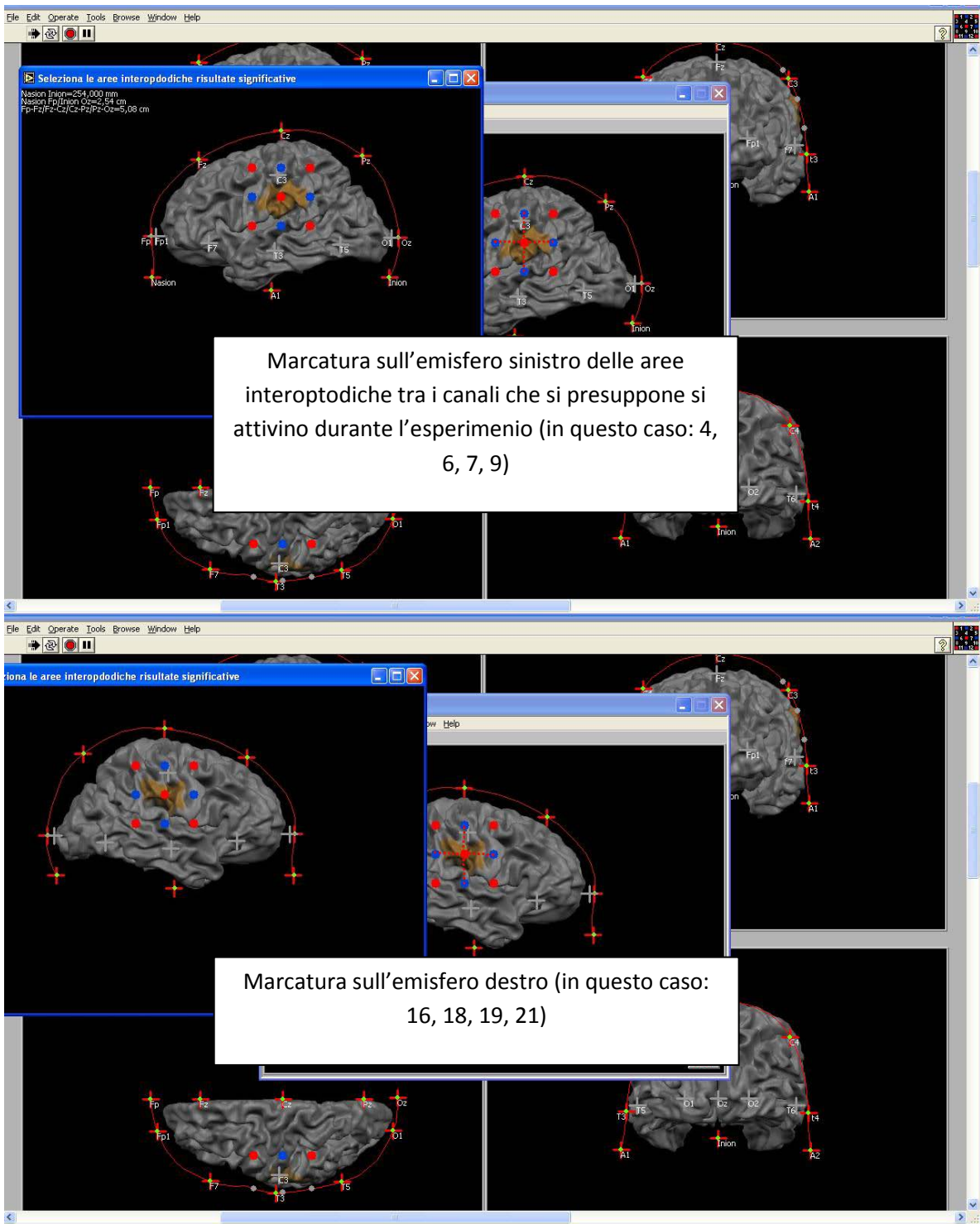




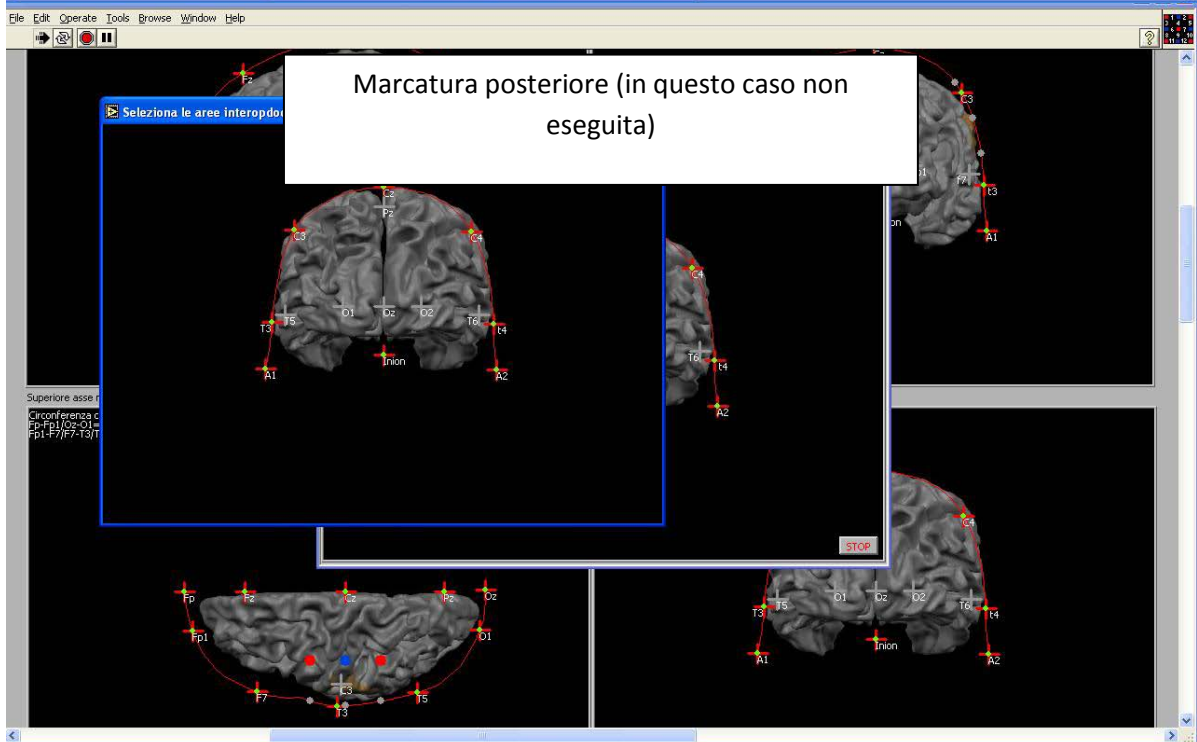
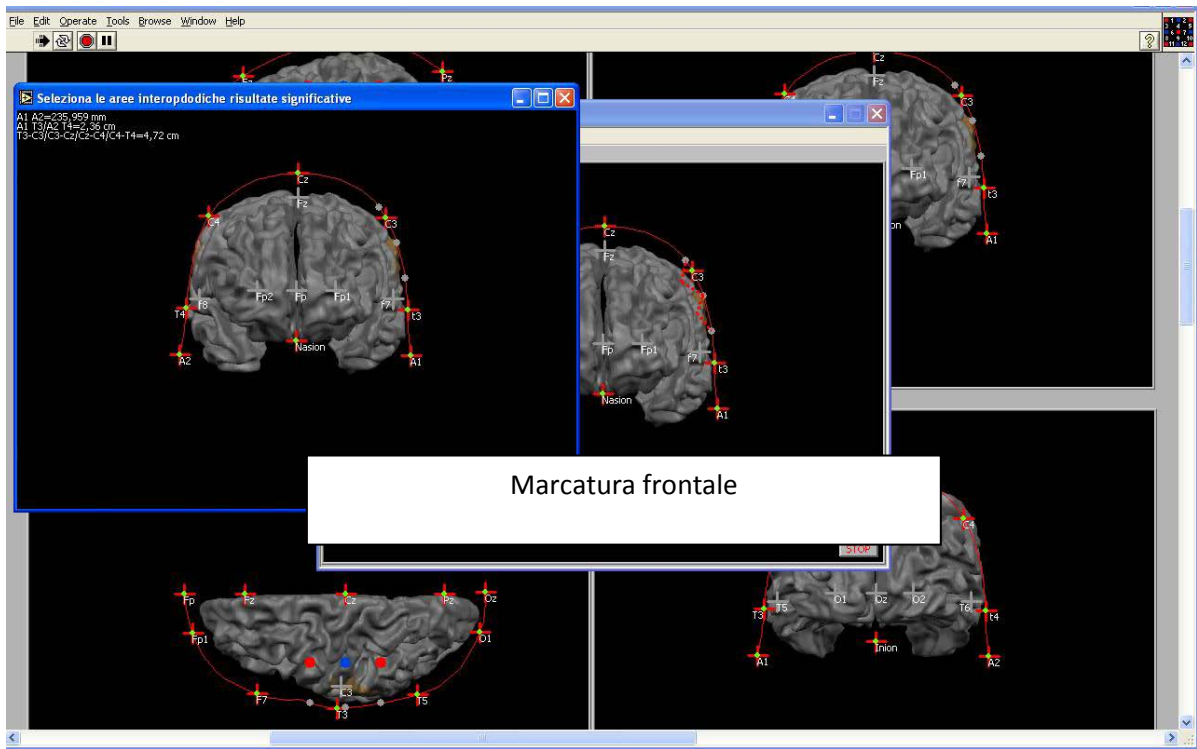


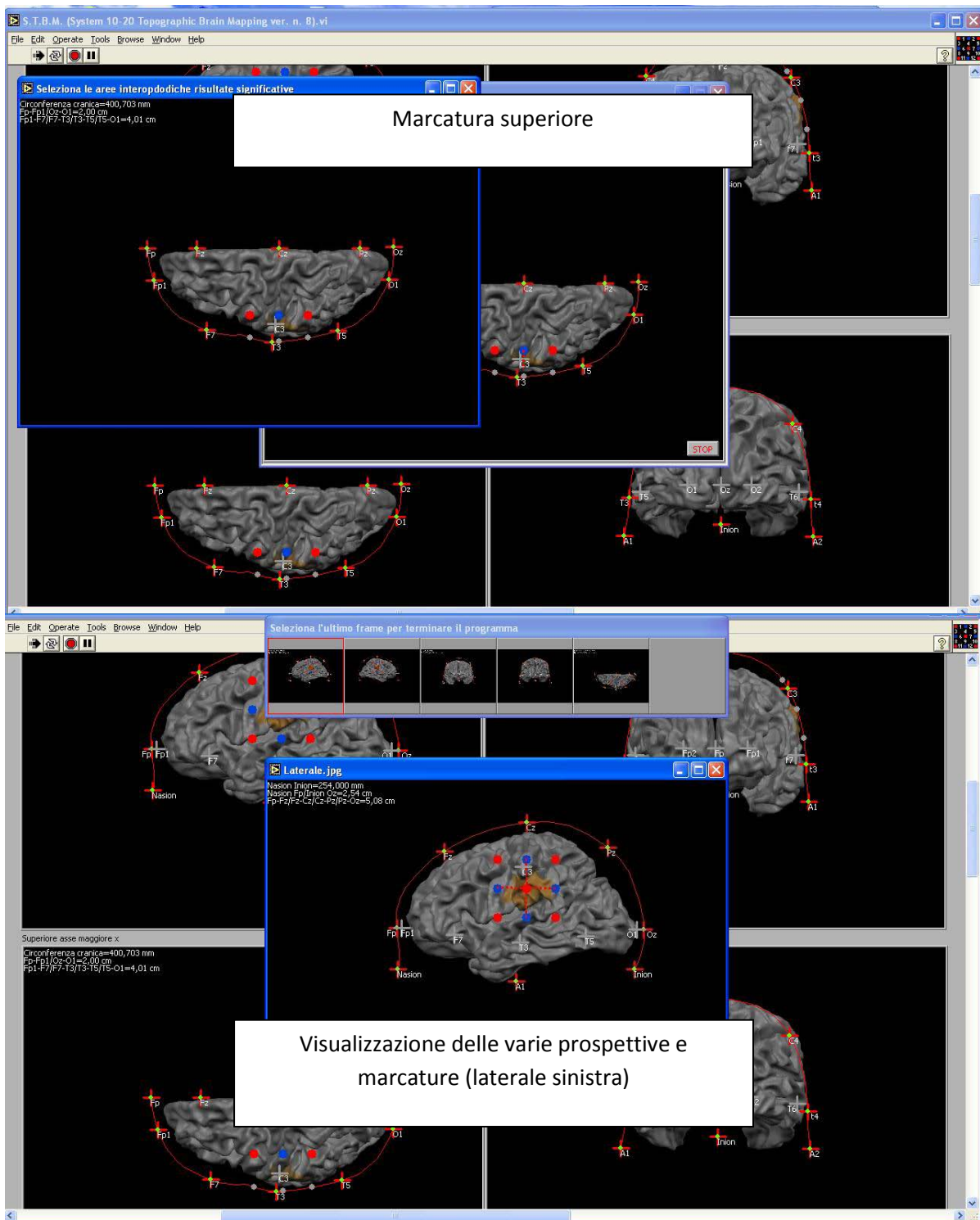




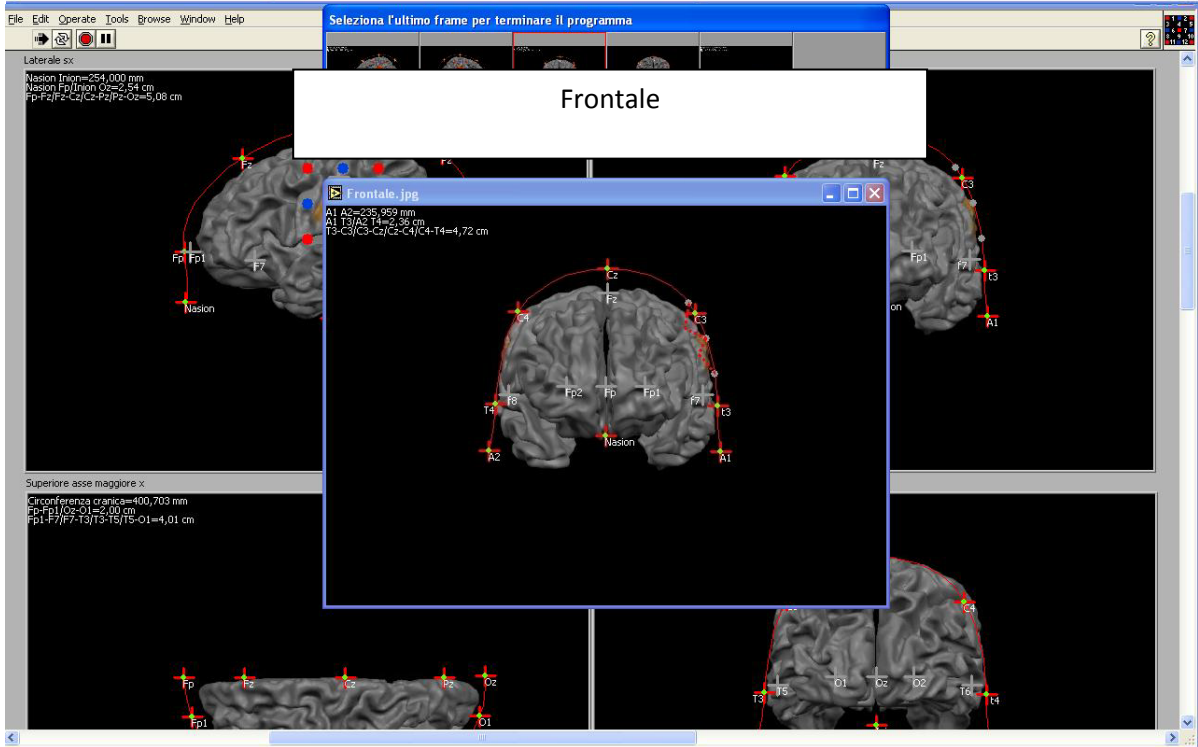
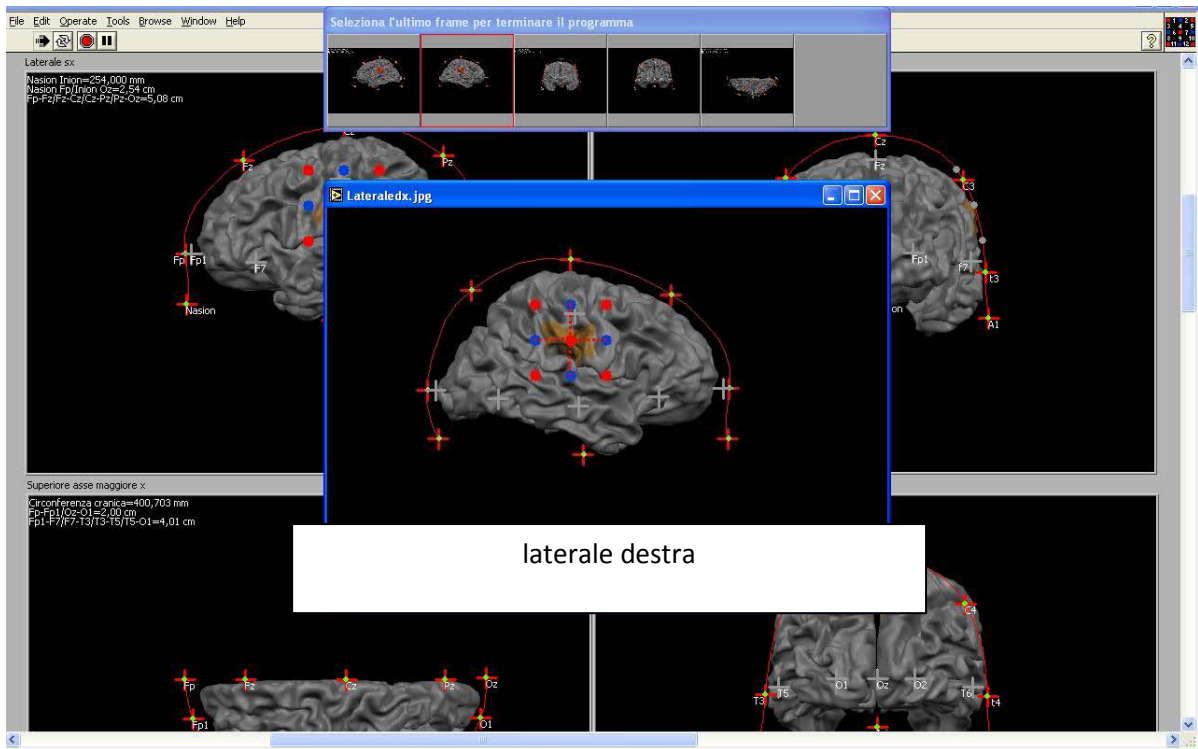


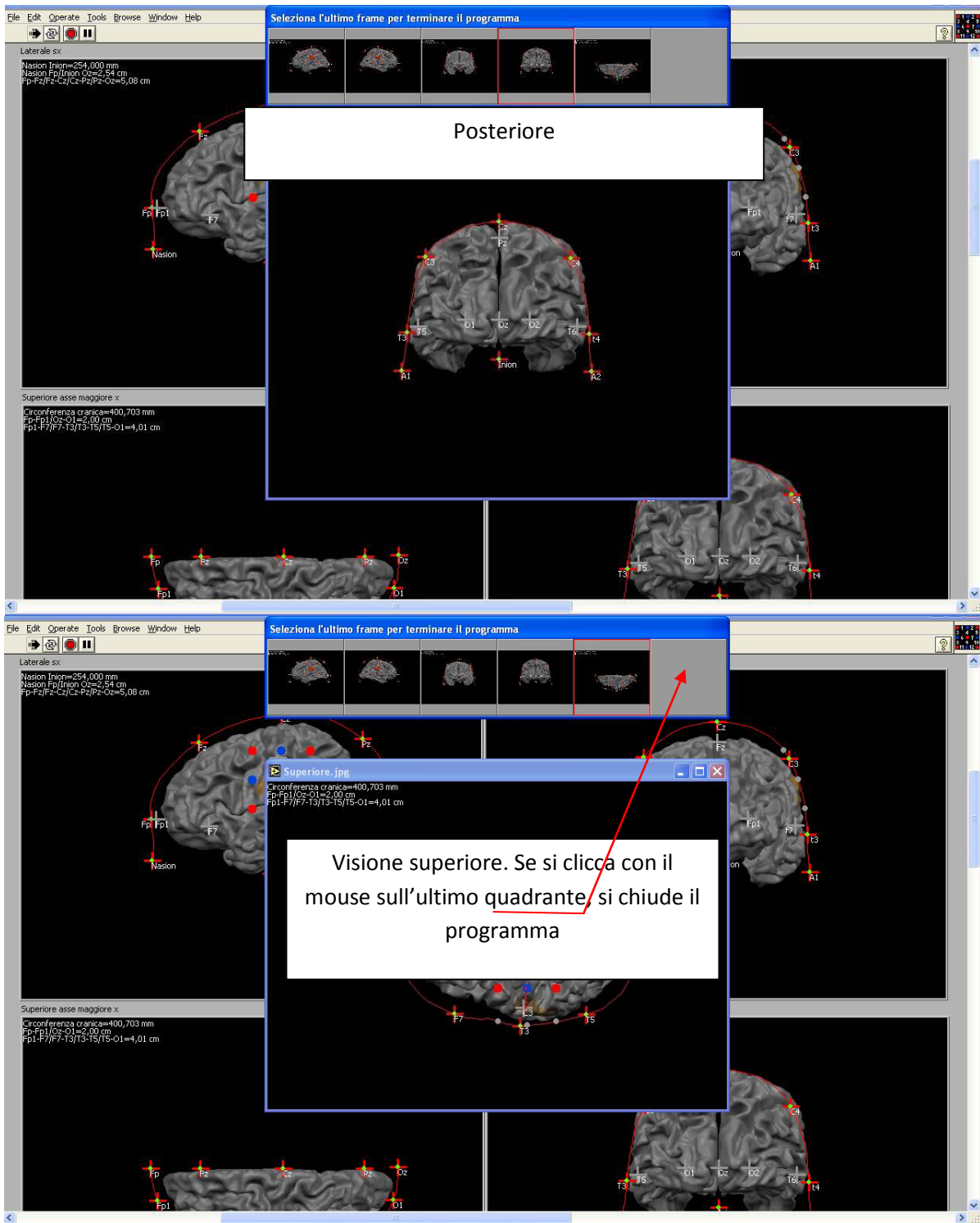












Sequenza 7 (S.T.B.M.: interfaccia utente e descrizione passo passo del funzionamento)

Ammettendo si fosse ipotizzata l'attivazione dei canali numero 4, 6, 7 e 9 e riscontrando invece, contrariamente alle aspettative, attivo solamente il canale numero 3, confrontando le prospettive ricavate dal programma STBM, con quelle di BrainVoyager, è possibile risalire a posteriori all'area sottostante il canale attivo, semplicemente evidenziando l'area corticale sul programma BrainVoyager (figura 4, 8.3).

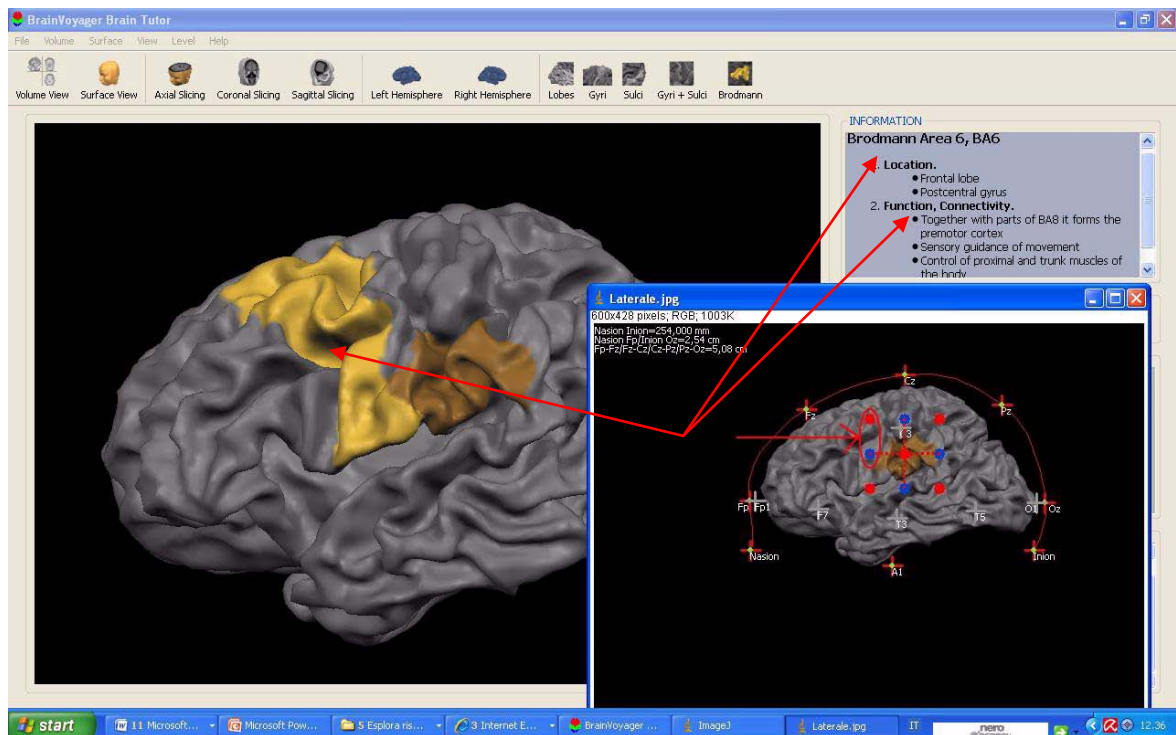


Figura 4 (verifica dell'area cerebrale attiva in base al canale NIRs attivato)

In base all'area o alle aree di interesse, tramite il programma STBM, si sovrappone la cuffietta del programma (rappresentata con cerchietti colorati rosso e blu) all'area di interesse, in modo da coprirlo con più canali possibile e facendo sì che uno degli optodi coincida o si avvicini ad uno o più punti di riferimento visualizzati sulla prospettiva. Conoscendo la distanza di tale punto, la si calcola direttamente sulla testina del bambino per poi posizionarci sopra l'optodo della cuffia reale corrispondente a quello sovrapposto della cuffia nel programma. La cuffietta è correttamente posizionata per indagare l'area di interesse con notevole risparmio di tempo ed onere contrariamente richiesti utilizzando direttamente il sistema 10-20. Nella figura 4, 8.3 l'optodo numero due è posizionato qualche millimetro sopra il punto di riferimento C3, che nell'esempio dista da A1 7 cm.

## Capitolo 9

### Tecnica di costruzione della testa da utilizzare come modello di riferimento nel programma

### S.T.B.M.

#### 9.1 Realizzazione delle immagini per il software S.B.T.M.

Analizziamo gli aspetti principali per comprendere la tecnica di costruzione della testina utilizzata come “modello” di riferimento nel programma S.T.B.M. (sequenza 1, 9.1).

Tramite BrainVoyager si esporta l'immagine della prospettiva sagittale

Tramite BrainVoyager si esporta come immagine la prospettiva coronale

La traslazione dell'asse Z ha sempre il valore 10 mentre la rotazione sull'asse Y e Z varia a seconda della prospettiva

The image displays two screenshots of the BrainVoyager software interface. The top screenshot shows a sagittal view of a brain MRI scan. The control panel on the right includes a 'Translation' section with sliders for X, Y, and Z axes, and a 'Rotation' section with sliders for X, Y, and Z axes. The Z translation slider is set to 10. The Y rotation slider is set to 180. The bottom screenshot shows a coronal view of the same brain MRI scan. The control panel on the right is similar, but the Z rotation slider is set to 90. Both screenshots include a 'TIPS' section with instructions on how to use the software's visualization tools.

Tramite BrainVoyager si esporta l'immagine della prospettiva trasversale

Tip: Click in the main window, hold the mouse button down and move the mouse

Tip: Click the head and brain icons

Poi la prospettiva sagittale dell'emisfero destro

Tip: Click in the main window, hold the mouse button down and move the mouse

Tip: Click the head and brain icons



Poi la prospettiva laterale dell'emisfero sinistro

Tip: Click in the main window, hold the mouse button down and move the mouse

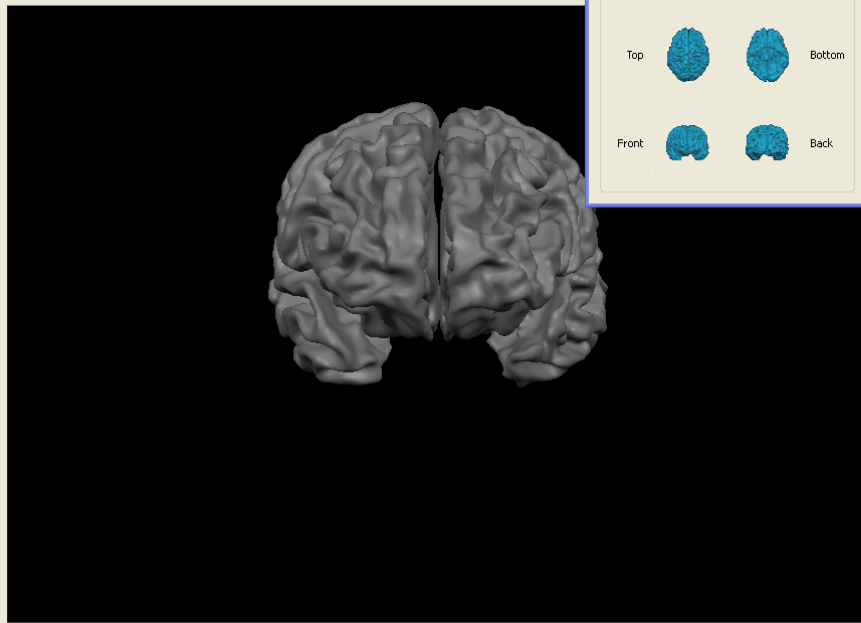
Tip: Click the head and brain icons

Poi la prospettiva del cervello visto dall'alto

Tip: Click in the main window, hold the mouse button down and move the mouse

Tip: Click the head and brain icons

## Poi la prospettiva frontale



Left Right  
Top Bottom  
Front Back

Translation  
X Y Z  
500 0 10

Rotation  
X axis Y axis Z axis  
0 -180 -90

Perspective projection

Close

X: 0 Y: 0 Z: 0

### TIPS

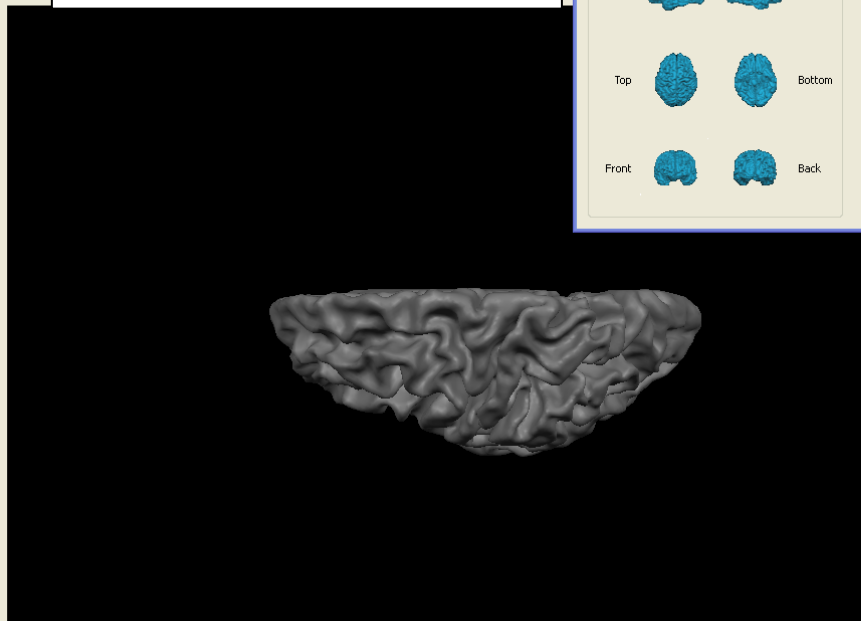
- Explore different visualizations of the brain: Slices and 3D models. The head and brain icons provide a different view on the brain.
- Click the right mouse button on a background region. The appearing context menu provides display options.

### INSTRUCTIONS

- Click in the main window with the left mouse button.
- **Selection:** Click at various regions of the brain while holding down the CTRL key. Redo to remove label.
- **Translation:** Move the mouse up and down as well as left and right while keeping the mouse button pressed.
- **Rotation:** As with "Translation", in addition press the SHIFT key.
- **Zoom:** As with "Translation", in addition press the SHIFT and CTRL key.

Tip: Click

## Infine l'emisfero sinistro del cervello visto dall'alto (topx)



Left Right  
Top Bottom  
Front Back

Translation  
X Y Z  
500 0 10

Rotation  
X axis Y axis Z axis  
0 -90 0

Perspective projection

Close

Tip: Click the head and brain icons

### TIPS

- Explore different visualizations of the brain: Slices and 3D models. The head and brain icons provide a different view on the brain.
- Click the right mouse button on a background region. The appearing context menu provides display options.

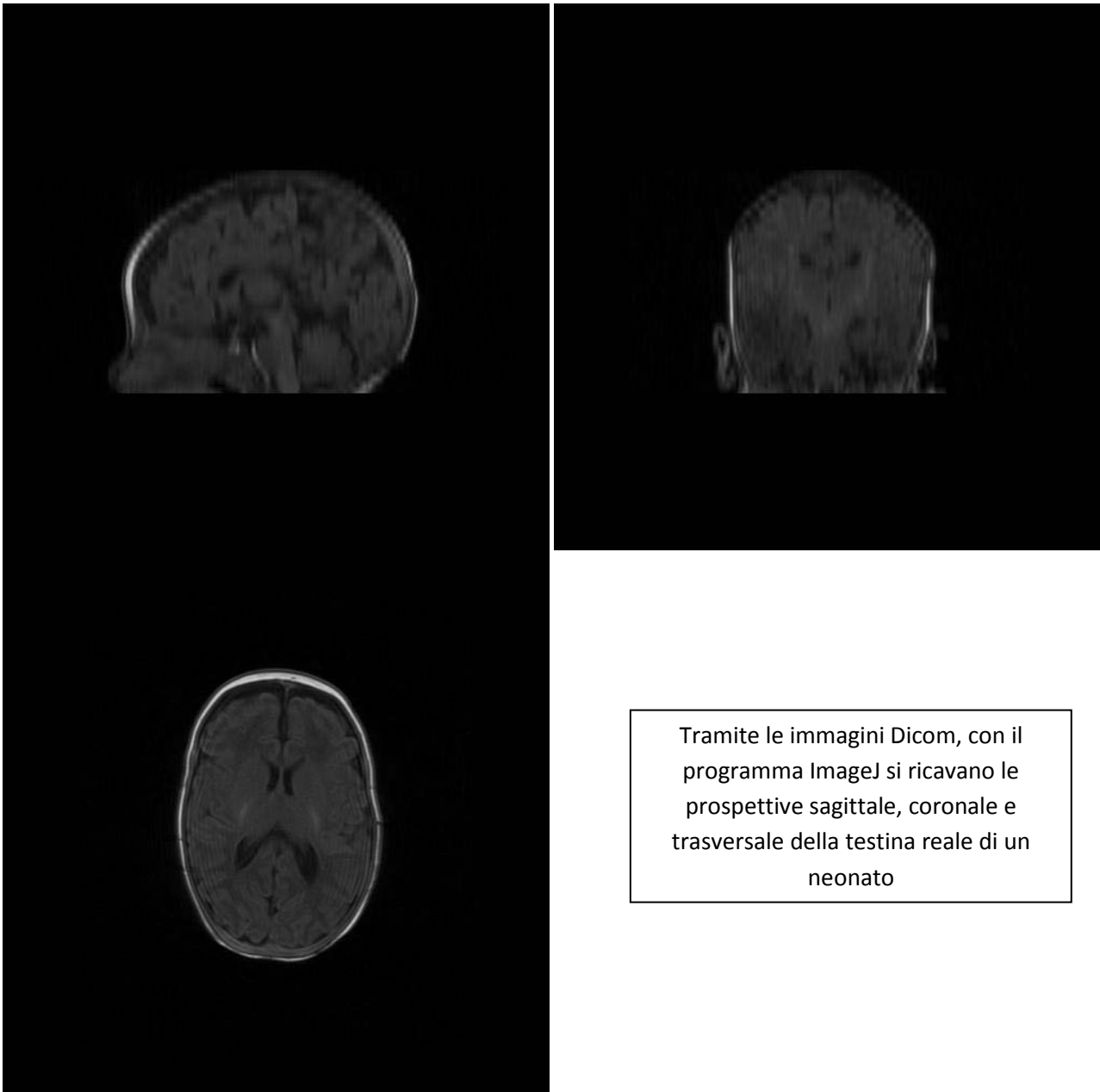
### INSTRUCTIONS

- Click in the main window with the left mouse button.
- **Selection:** Click at various regions of the brain while holding down the CTRL key. Redo to remove label.
- **Translation:** Move the mouse up and down as well as left and right while keeping the mouse button pressed.
- **Rotation:** As with "Translation", in addition press the SHIFT key.
- **Zoom:** As with "Translation", in addition press the SHIFT and CTRL key.

Tip: Click in the main window, hold the mouse button down and move the mouse

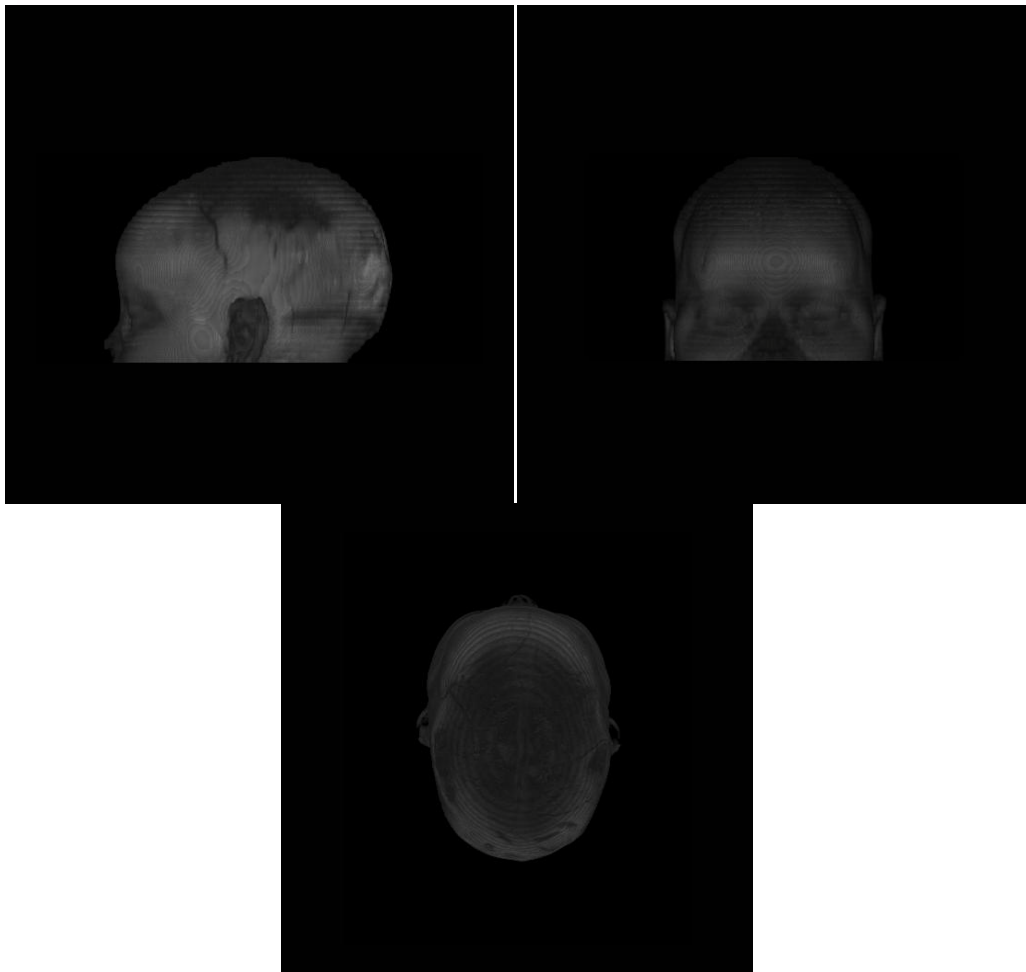
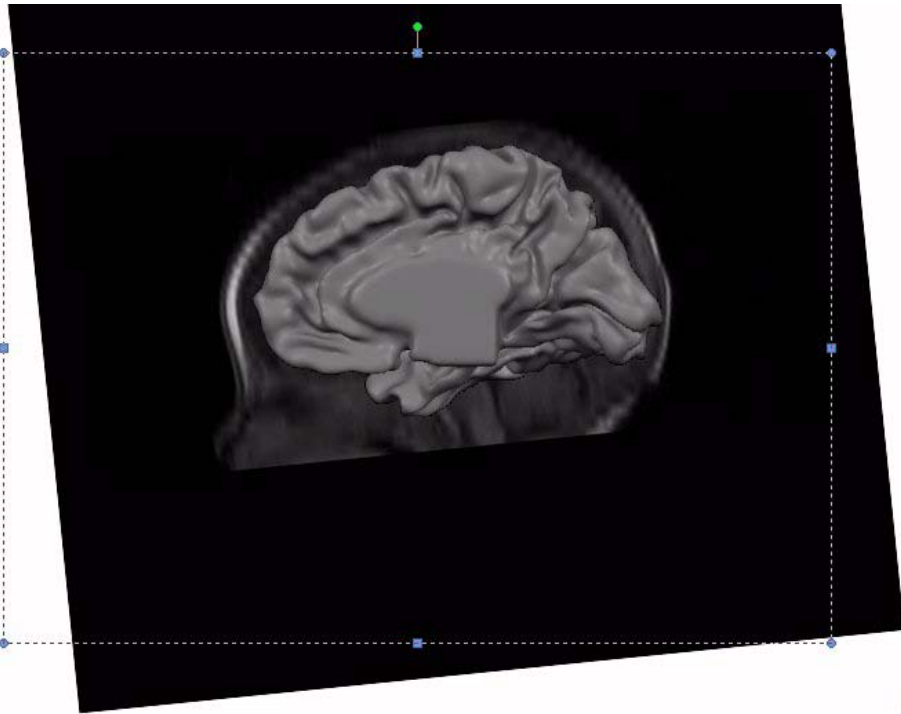
Tip: Click the head and brain icons





Sequenza 1 (tecnica di costruzione passo passo, della testa utilizzata come modello di riferimento nel programma S.T.B.M.)

Le prospettive sagittali, coronali e trasversali ricavate dalle immagini Dicom (D) si sovrappongono a quelle ricavate da Brain Voyager (B) e fatte corrispondere il più possibile ridimensionandole e ruotandole. Poi si sovrappongono le prospettive del cervello alle rispettive prospettive sagittale, coronale e trasversale e si ricavano tramite le immagini Dicom le prospettive laterale, frontale e superiore, della testa reale di un neonato preso come campione di riferimento (sequenza 2, 9.1).



Sequenza 2 (tecnica utilizzata per sovrapporre il cervello ricavato da Brain Voyager, a quello ricavato dalle immagini Dicom tramite ImajeJ)

A questo punto si sovrappone ad ogni prospettiva, la reciproca con l'immagine della testa reale del neonato (figura 1, 9.1).

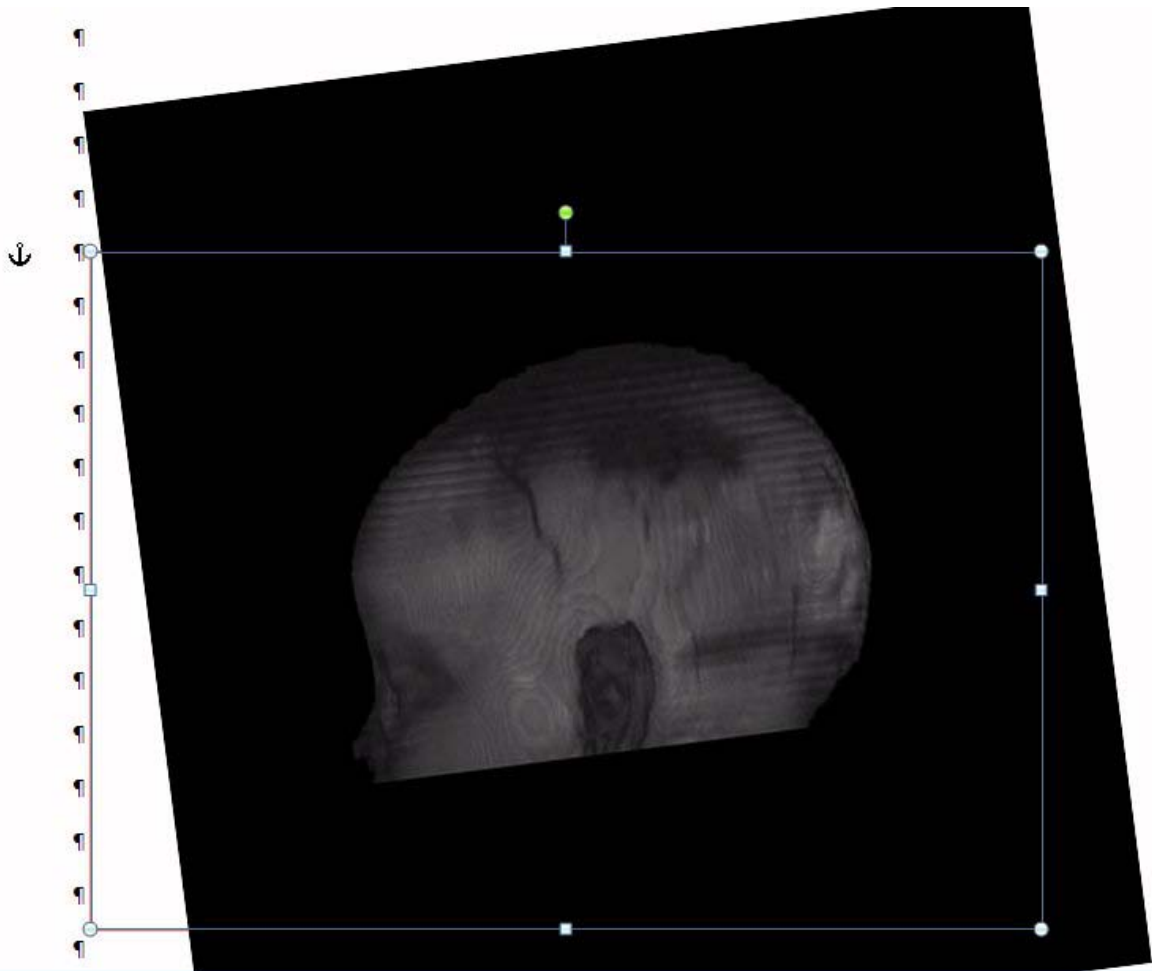
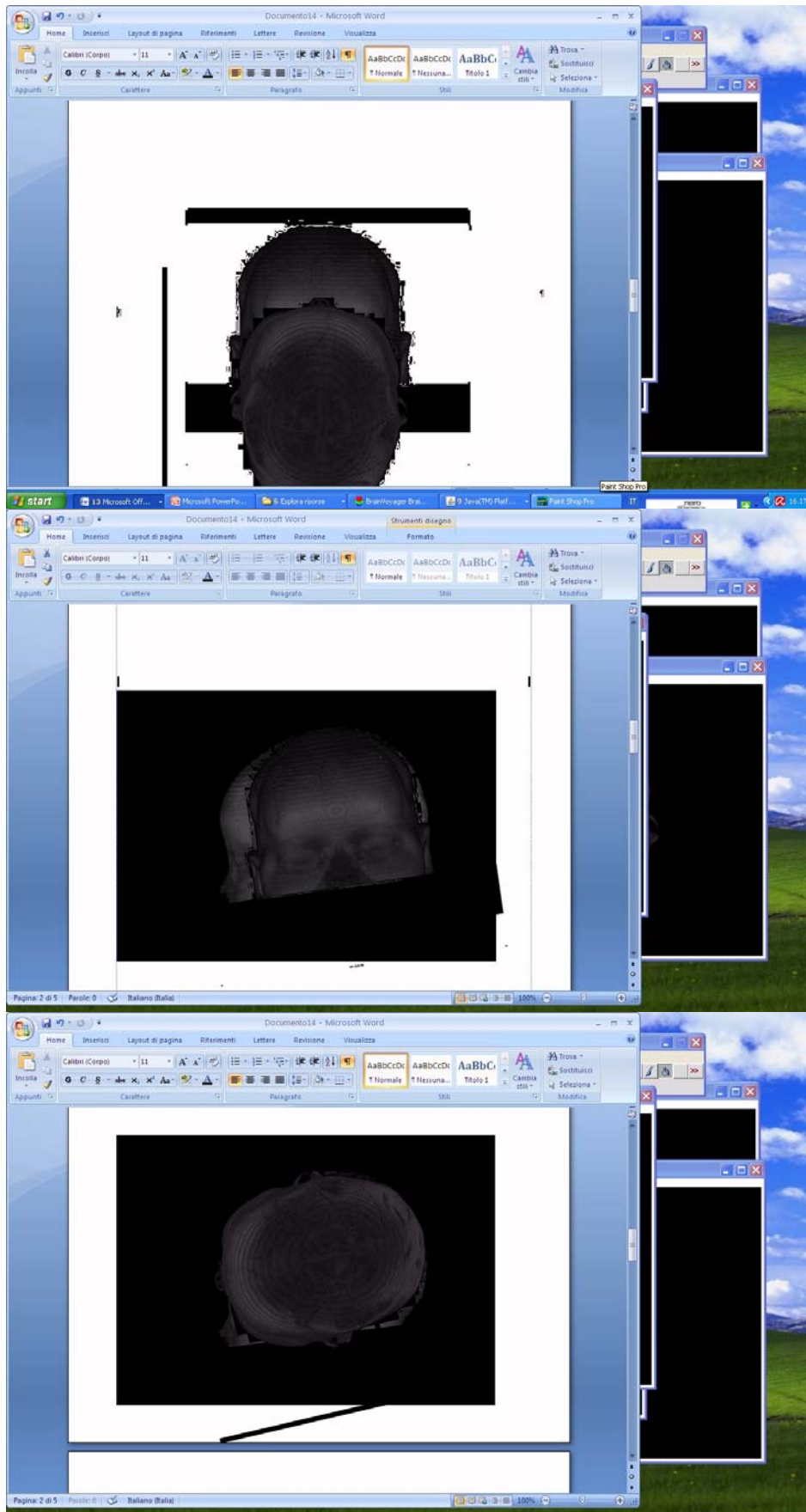


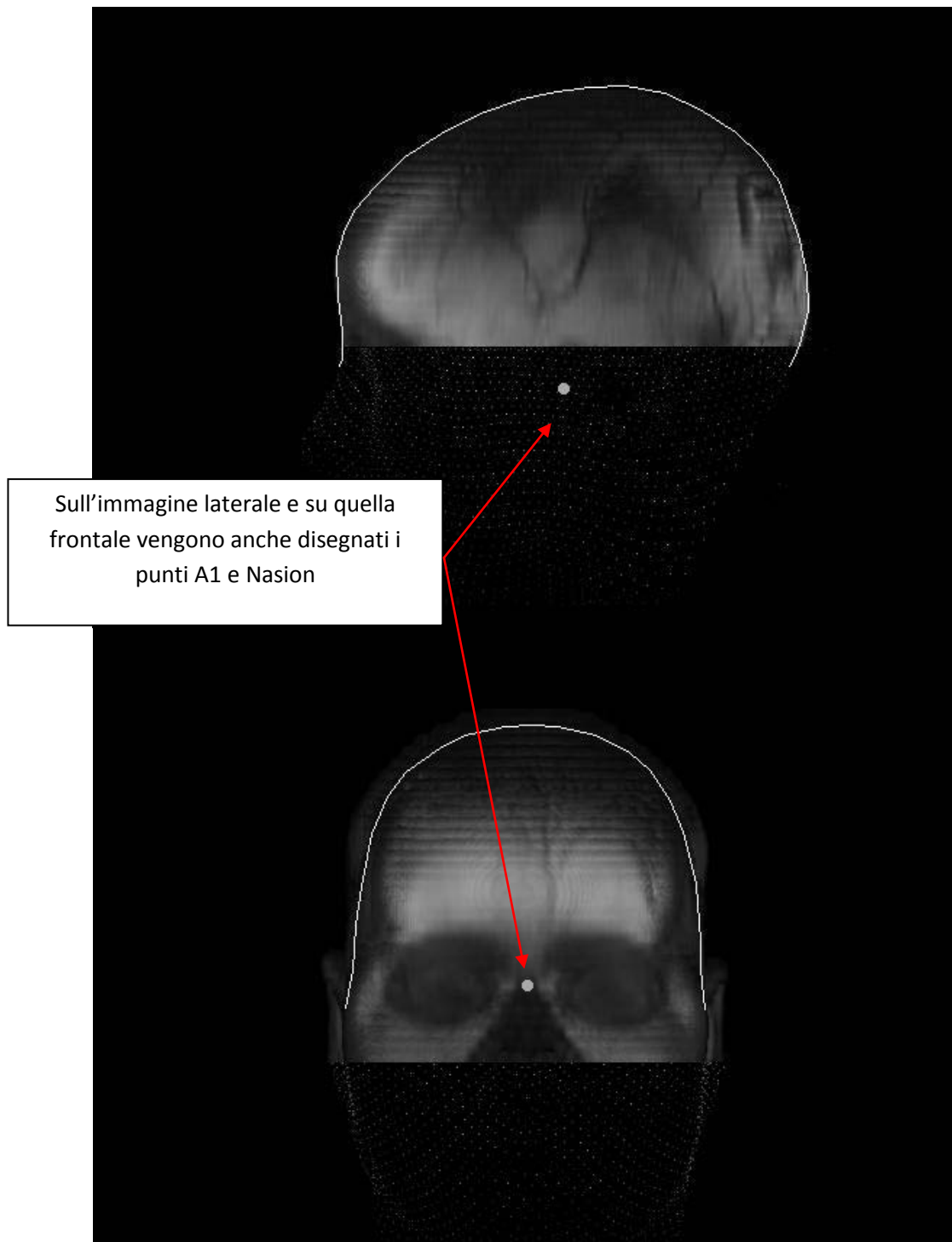
Figura 1 (sovrapposizione delle immagini Dicom con quelle del Cervello)

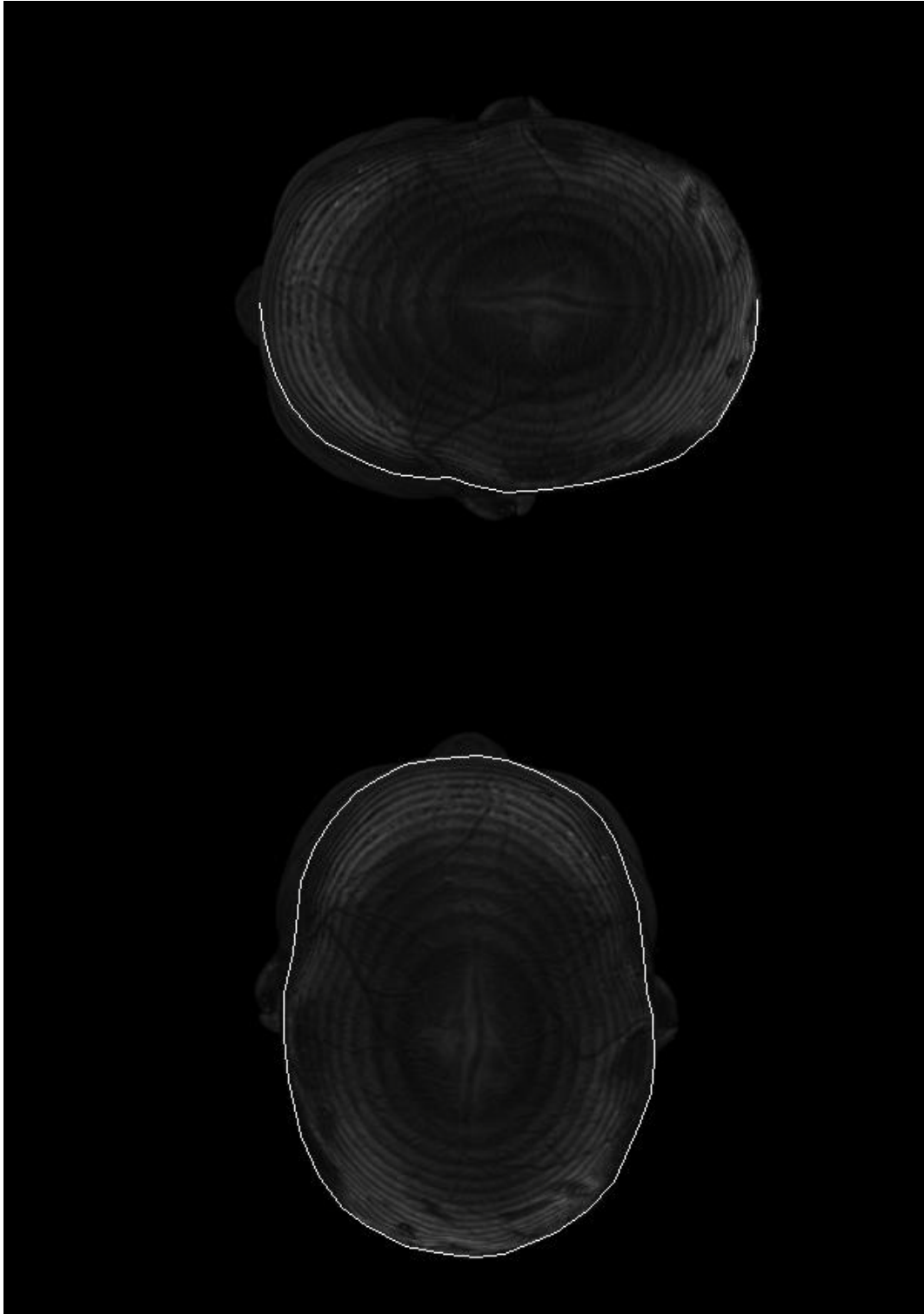
Tagliando l'immagine sul bordino evidenziato, che corrisponde al bordo dell'immagine del cervello sottostante, ricavata con Brain Voyager, si ottiene la testina utilizzata come "modello" di riferimento in S.T.B.M, che nell'esempio in figura 1, sarà proporzionale alla visione prospettica dell'emisfero laterale sinistro di Brain Voyager , ridotta alla risoluzione di 600 X 428 pixel. Lo stesso procedimento è utilizzato per tutte le prospettive. Tutte le prospettive sono poi sovrapposte l'una all'altra per verificarne le reciproche proporzioni ed eventualmente apportare le ultime correzioni (sequenza 3, 9.1).



Sequenza 3 (verifica delle proporzioni tramite sovrapposizioni di tutte le prospettive)

Prima di poter essere utilizzate, ogni prospettiva è ridotta a 256 tonalità di grigio e su tutte le prospettive, al confine tra il bordo della testa e lo sfondo nero, è sovrapposta una linea di colore bianco corrispondente al collegamento Nasion Inion, A1 A2, metà circonferenza cranica e circonferenza cranica. La conversione in tonalità di grigio e la creazione della linea bianca, possono essere realizzati direttamente con ImageJ (sequenza 4,9.1).





Sequenza 4 (conversione delle immagini in tonalità di grigio e creazione sulle prospettive dei contorni cranici corrispondenti alle distanze Nasion-Inion, A1-A2 e circonferenza cranica)

Alla fine le immagini risultanti devono essere 4 e nominate rispettivamente: lat.jpg, front.jpg, topx.jpg e topy.jpg.

## 9.2 Costruzione delle immagini del cervello da utilizzare con il programma S.T.B.M.

Di seguito, è mostrata la tecnica con cui sono generate con Brain Voyager le immagini del cervello, per essere poi utilizzate con il programma S.T.B.M (sequenza 5, 9.2).

**BrainVoyager Brain Tutor**

File Volume Surface View Level Help

Preferences...  
Save Display Window...  
Save Snapshot...  
Exit

Axial Slicing Coronal Slicing Sagittal Slicing Left Hemisphere Right Hemisphere

**Viewpoint**

Translation X Y Z Rotation X axis Y axis Z axis

500 0 10 0 180 0

Perspective projection

TIPS

- Explore different visualizations of the brain: Slices and 3D models. The head and brain icons provide a different view on the brain.
- Click the right mouse button on a background region. The appearing context menu provides display options.

• **Rotation:** As with "Translation", in addition press the SHIFT key.  
• **Zoom:** As with "Translation", in addition press the SHIFT and CTRL key.

Tip: Click in the main window, hold the mouse button down and move the mouse

Tip: Click the head and brain icons

Deselezionare la casella della visione prospettica.

Eliminare le proiezioni x y z premendo contemporaneamente [shift] + [a].

Inserire il valore 10 relativo alla traslazione sull'asse Z.

**BrainVoyager Brain Tutor**

File Volume Surface View Level Help

Preferences...  
Save Display Window...  
Save Snapshot...  
Exit

Axial Slicing Coronal Slicing Sagittal Slicing Left Hemisphere Right Hemisphere

**Viewpoint**

Translation X Y Z Rotation X axis Y axis Z axis

500 0 10 0 -100 -90

Perspective projection

TIPS

- Explore different visualizations of the brain: Slices and 3D models. The head and brain icons provide a different view on the brain.
- Click the right mouse button on a background region. The appearing context menu provides display options.

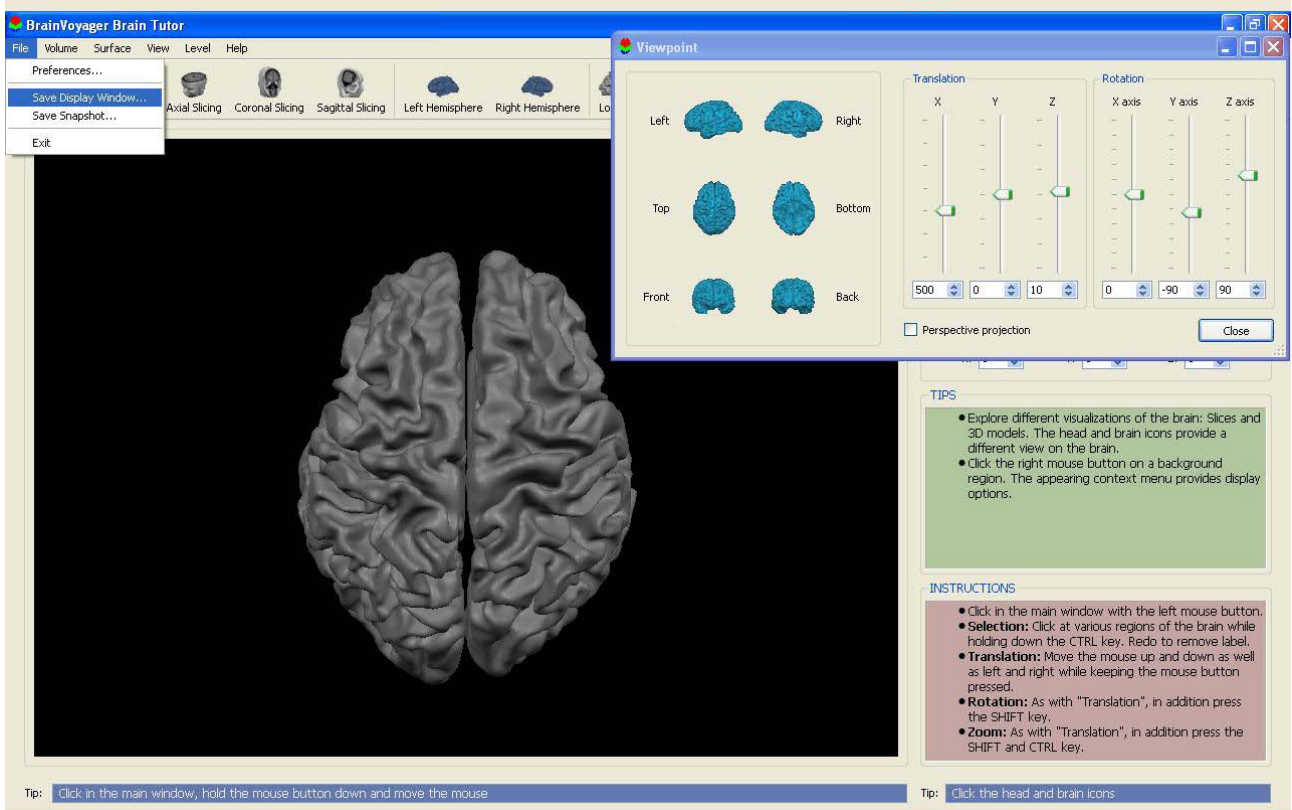
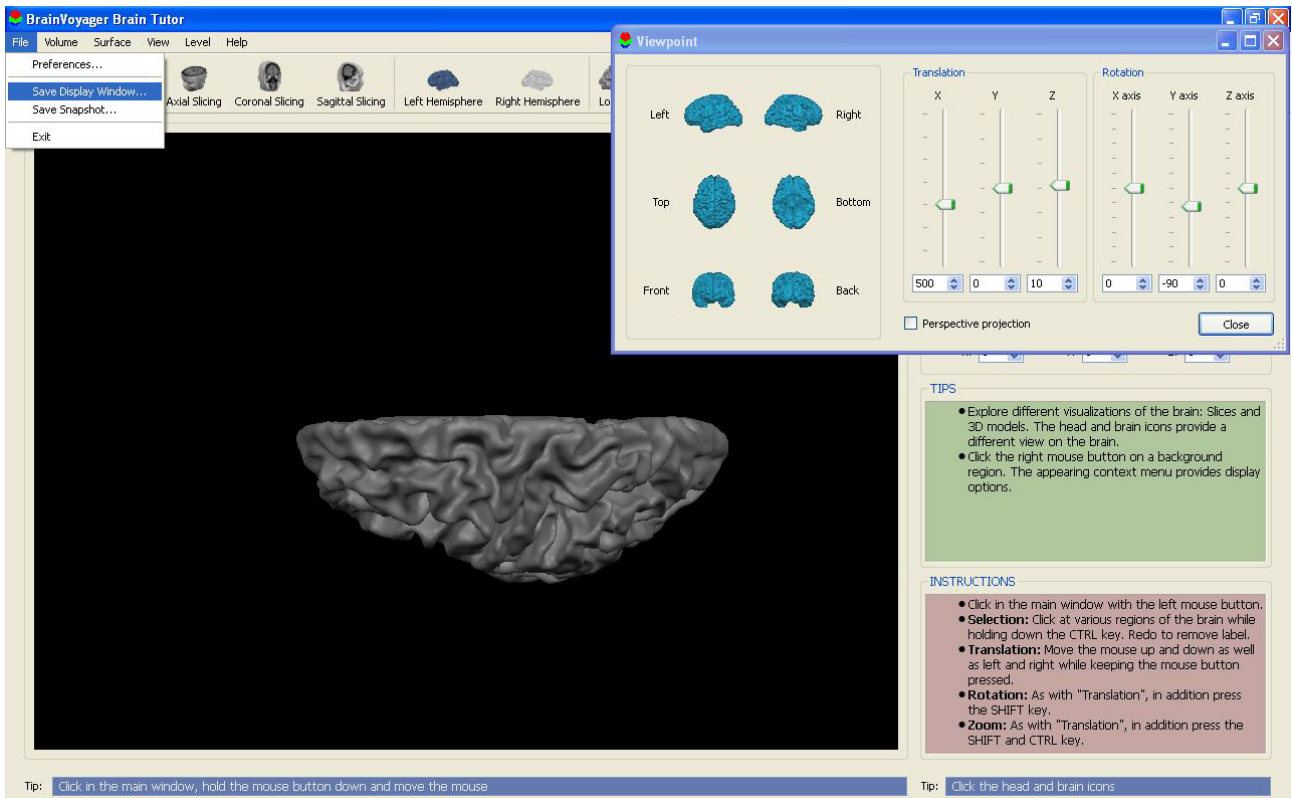
INSTRUCTIONS

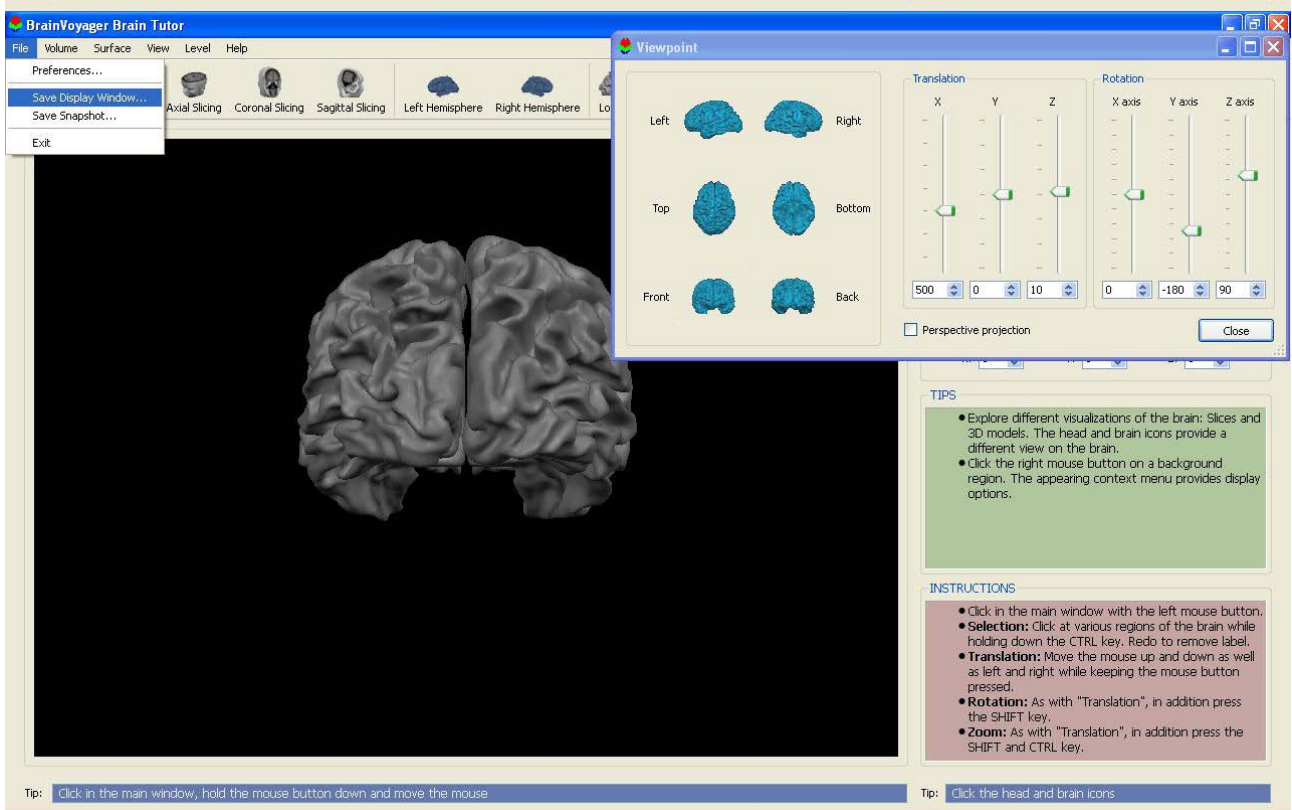
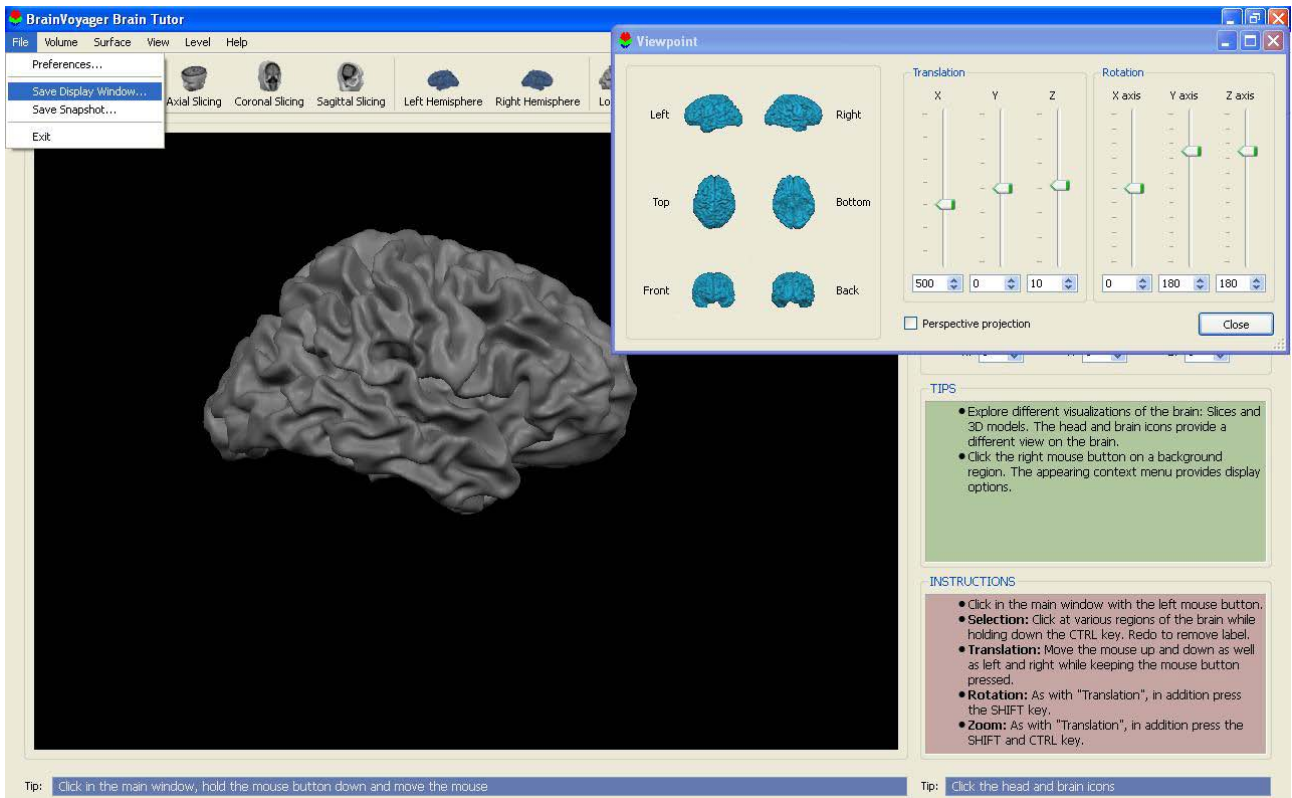
- Click in the main window with the left mouse button.
- Selection:** Click at various regions of the brain while holding down the CTRL key. Click to remove label.
- Translation:** Move the mouse up and down as well as left and right while keeping the mouse button pressed.
- Rotation:** As with "Translation", in addition press the SHIFT key.
- Zoom:** As with "Translation", in addition press the SHIFT and CTRL key.

Tip: Click in the main window, hold the mouse button down and move the mouse

Tip: Click the head and brain icons







Sequenza 5 (tecnica per la realizzazione delle prospettive del cervello tramite Brain Voyager)

Nella sequenza 5 sono generate 6 immagini in formato png e con risoluzione 860 X 615. Le prospettive sono: emisfero sinistro visto lateralmente, emisfero destro visto lateralmente, cervello visto frontalmente, cervello visto posteriormente, cervello visto dall'alto e metà cervello visto dall'alto ruotato di -90 gradi sull'asse y. Tutte le immagini devono essere ridimensionate, salvate in formato jpg utilizzando i nomi chiesti dal programma S.T.B.M. Aprire l'immagine (\*.png 860 X 614) con un programma di fotoritocco che abbia la funzione [resize]. Convertire l'immagine in 600 X 428 pixel. Salvarle con i nomi seguenti: lat1.jpg per l'emisfero sinistro, front1.jpg per il cervello visto anteriormente, back.jpg per il cervello visto posteriormente, latdx.jpg per l'emisfero destro, topx1.jpg per metà cervello visto dall'alto ruotato di -90 gradi sull'asse y e topy1 per il cervello visto dall'alto. Tutte le operazioni possono essere eseguite utilizzando ad esempio il programma ImageJ.

## CONCLUSIONI

L'applicazione di tecniche ottiche è diventato un campo sempre più importante in quanto offre la possibilità di rapide immagini funzionali e dispositivi in tempo-reale, con la caratteristica fondamentale di non recare alcun danno al soggetto durante l'analisi. L'obiettivo principale di questo lavoro è stato, oltre che descrivere la metodologia e il funzionamento dell'apparecchiatura NIRs, fornire le competenze per realizzare i supporti delle fibre ottiche ed adattarli alle più svariate esigenze, in base ai tessuti esplorati. Un'importante caratteristica del sistema descritto è la semplice ed economica realizzazione, dato che sono stati utilizzati tutti materiali facilmente reperibili e la tecnica di costruzione non richiede attrezzature particolari (il tornio può essere sostituito da un semplice trapano a colonna).

Un'altra caratteristica di questo lavoro, riguarda la realizzazione del software per il corretto e veloce posizionamento della cuffia sulla testina dell'infant. Il software è fornito compilato e dotato di installatore per cui può essere facilmente installato e rimosso dal sistema. Qualsiasi sperimentazione, soprattutto con i neonati nati a termine, impegnati in compiti cognitivi e attentivi, richiede una certa ottimizzazione dei tempi, sia in termini di preparazione del setting sperimentale che di esecuzione dell'esperimento. L'attenzione che un neonato può prestare per l'esecuzione di semplici compiti attentivi, quali ad esempio guardare uno stimolo presentato in uno schermo, è molto limitata temporalmente. Il corretto posizionamento della cuffia in tempi accettabili, evita il rischio che il neonato si addormenti ancora prima di iniziare l'esperimento. Il software S.B.T.M consente di utilizzare il sistema di riferimento internazionale 10-20, senza l'onere di dover tracciare i vari punti di riferimento sulla testina dell'infant, che risulterebbe piuttosto impegnativo in termini di tempo e possibilità di precisione.

Partendo dal lavoro svolto in questa tesi di dottorato, ci sono almeno due possibili sviluppi; il primo riguarda la possibilità di costruire supporti per le fibre ottiche sempre più leggeri e

resistenti, dato il continuo progresso tecnologico e la realizzazione di materiali sempre più innovativi. L'altro è relativo allo sviluppo del software S.T.B.M, in cui la testina del neonato, ora rappresentata in varie prospettive bidimensionali, potrebbe essere rappresentata in tre dimensioni. In pratica si tratterebbe di integrare le funzioni che attualmente svolge il programma BrainVoyager Brain Tutor, all'interno del programma S.T.B.M.

## Riferimenti bibliografici

- Adolphs, R. (2001). The neurobiology of social cognition. *Current Opinion in Neurobiology*, **11**, 231-239.
- Adolphs, R. (2003). Cognitive neuroscience of human social behaviour. *Nature Reviews Neuroscience*, **4**, 165-178.
- Aguirre, G. K., Zarahn, E. & D'Esposito, M. (1998). The Variability of Human, BOLD Hemodynamic Responses. *NeuroImage*, **8**, 360-369.
- Aslin, R. N. & Mehler, J. (2005). Near-infrared spectroscopy for functional studies of brain activity in human infants: promise, prospects, and challenges. *Journal of Biomedical Optics*, **10**, 01-009.
- Baron-Cohen, S. (1994). How to build a baby that can read minds: Cognitive mechanisms in mindreading. *Cahiers de Psychologie Cognitive/Current Psychology of Cognition*, **13**, 513-552.
- Bartocci, M., Winberg, J., Papandieck, G., Mustica, T., Serra, G. & Lagercrantz, H. (2001). Cerebral haemodynamic response to unpleasant odors in the preterm newborn measured by near infrared spectroscopy. *Pediatric research*, **50**, 324-330.
- Bartocci, M., Lagercrantz, H. & Anand, K. J. (2006). Pain activates cortical areas in the preterm newborn brain. *Pain*, **122**, 109-117.
- Bartocci, M., Winberg, J., Ruggero, C., Bergqvist, L. L., Serra, G. & Lagercrantz, H. (2000). Activation of olfactory cortex in newborn infants after odor stimulation. a functional near-infrared spectroscopy study. *Pediatric Research*, **48**, 18-23.
- Bates, E., Elman, J., Johnson, M., Karmiloff-Smith, A., Parisi, D. and Plunkett, K., 1998. Innateness and emergentism. In: Bechtel, W. and Graham, G. Editors, 1998. *A companion to cognitive science* Blackwell Publishers, Malden, MA and Oxford, 590-601.
- Beauchamp, M. S., Lee, K. E., Haxby J. V. & Martin, A. (2003). fMRI Responses to Video and Point-Light Displays of Moving Humans and Manipulable Objects. *Journal of Cognitive Neuroscience*, **15**, 991-1001.

- Binder, J. R., Rao, S. M., Hammeke, T. A., Frost, J. A., Bandettini, P. A. & Jesmanowicz, A. (1995). Lateralized human brain language systems demonstrated by task subtraction functional magnetic resonance imaging. *Archives of Neurology*, **52**, 593-601.
- Blair, R. J. R. & Cipolotti, L. (2000). Impaired social response reversal: a case of acquired 'sociopathy'. *Brain*, **123**, 1122-1141.
- Bonda, E., Petrides, M., Ostry, D. & Evans, A. (1996). Specific Involvement of Human Parietal Systems and the Amygdala in the Perception of Biological Motion. *Journal of Neuroscience*, **16**, 3737-3744.
- Bucher H.U., Edwards A.D., Lipp A.E. & Duc G. (1993). Comparison between near infrared spectroscopy and Xenon clearance for estimation of cerebral blood flow in critically ill preterm infants. *Pediatric Research*, **33** (1), 56-60.
- Butti, M., Pastori, A., Merzagora, A., Bianchi, A., Bardoni, A., Branca, V., Costa, A., Cerutti, S. & Reni, G. (2006). Combining Near Infrared Spectroscopy and Functional MRI during Continuous Performance Test in Healthy Subjects. Proc. of EMBC 2006.
- Cabeza, R. & Nyberg, L. (2000). Imaging cognition II: An empirical review of 275 PET and fMRI studies. *Journal of Cognitive Neuroscience*, **12**, 1-47.
- Cant, J. S. & Goodale, M. A. (2007). Attention to form or surface properties modulates different regions of human occipitotemporal cortex. *Cerebral Cortex*, **17**, 713-731.
- Chance B., Zhuang Z., UnAh C., Alter C., Lipton L. (1993). Cognition-activated low-frequency modulation of light absorption in human brain. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **90**, 3770-3774.
- Cope, M. & Delpy, D. T. (1988). System for long-term measurement of cerebral blood and tissue oxygenation on newborn infants by near infra-red transillumination. *Medical and Biological Engineering and Computing*, **26**, 289-294.
- Csibra G., Henty J., Volein A., Elwell C., Tucker L., Meek J. & Johnson M.H. (2004). Near Infrared Spectroscopy reveals neural activation during face perception in infants and adults. *Journal of Pediatric Neurology*, **2** (2), 85-89.



Cutini, S., Scatturin, P., Menon, E., Bisiacchi, P. S., Gamberini, L., Zorzi, M. & Dell'Acqua R.(2008). Selective activation of the superior frontal gyrus in task-switching: an event-related fNIRS study. *Neuroimage*, **42**, 945-955.

De Blasi, R. A., Alviggi, I., Cope, M., Elwell, C., Ferrari, M. (1994,a). Non invasive measurement of forearm oxygen consumption during exercise by near infrared spectroscopy. *Advances in experimental medicine and biology*, **345**, 685-692.

de Haan, M. & Groen, M. (2006). Chapter 3: Neural bases of infants' processing of social information in faces. In: P.J. Marshall and N.A. Fox (Eds.), *The Development of Social Engagement: Neurobiological Perspectives* (46-80). Oxford University Press, Oxford, UK.

Desmond, J. E. & Fiez, J. A. (1998). Neuroimaging studies of the cerebellum: language, learning and memory. *Trends in Cognitive Sciences*, **2**, 355-362 .

Duncan, A., Meek, J. H., Clemence, M., Elwell, C. E., Tyszczuk, L., Cope, M. & Delpy, D. T. (1995). Optical pathlength measurements on adult head, calf and forearm and the head of the newborn infant using phase resolved optical spectroscopy. *Physics in medicine and biology*, **40**(2):295304

Edwards, A.D., Richardson, C. & Cope, M. (1988). Cotside measurement of cerebral blood flow in ill newborn infants by near infrared spectroscopy. *Lancet*, **2** (8614), pp.770-771.

Edwards, A.D., Wyatt J.S., Richardson, C.E., Potter L.A., Cope, M., Delpy D.T. & Reynolds, E.O.R. (1990). Effects of indomethacin on cerebral haemodynamics in very preterm infants. *Lancet*, **335**, pp. 1491-1495.

Elman, J., Bates, E., Johnson, M., Karmiloff-Smith, A., Parisi, D. and Plunkett, K., 1996. . *Rethinking innateness: A connectionist perspective on development* MIT Press/Bradford Books, Cambridge.

Elwell, C. E., Cope, M., Edwards, A. D., Wyatt, J. S., Delpy, D. T. & Reynolds, E. O. (1994). Quantification of adult cerebral hemodynamics by near-infrared spectroscopy. *Journal of Applied Physiology*, **77**, 2753-2760.

Essenpreis, M., Cope, M., Elwell, C. E., Arridge, S. R., van der Zee, P. & Delpy, D. T. (1993). Wavelength dependence of the differential pathlength factor and the log slope in time-resolved tissue spectroscopy. *Advances in experimental medicine and biology*, **333**, 9-20.

- Fantini, S., Franceschini, M. A., Maier, J. S., Walker, S. A., Barbieri, B. & Gratton, E. (1995). Frequency-Domain Multichannel Optical Detector for Non-Invasive Tissue Spectroscopy and Oximetry. *Optical Engineering*, **34**, 32-42.
- Fantini, S., Hueber, D., Franceschini, M. A., Gratton, E., Rosenfeld, W., Stubblefield, P. G. & Stankovic, M. R. (1999). Non-invasive Optical Monitoring of the Newborn Piglet Brain Using Continuous-wave and Frequency-domain Spectroscopy. *Physics in Medicine and Biology*, **44**, 1543-1563.
- Fantz, R. & Miranda, S. B. (1975). Newborn infant attention to form of contour. *Child Development*, **46**, 224-228.
- Fantz, R. L. (1963). Pattern Vision in Newborn Infants. *Science*, **140**, 296-297.
- Fellman, D. J. & Van Essen, D. C. (1991). Distributed hierarchical processing in primate cerebral cortex. *Cerebral Cortex*, **1**, 1-47.
- Fodor, J. (1983). *The modularity of mind*, Cambridge, MA: MIT Press; Trad. It. (1988). *La mente modulare*, Ed. Il Mulino, Bologna.
- Fox, P. T & Raichle, M. E. (1986). Focal physiological uncoupling of cerebral blood flow and oxidative metabolism during somatosensory stimulation in human subjects. *Proceedings of the National Academy of Science USA*, **83**, 1140-1144.
- Franceschini, M. A., Toronov, V., Filiaci, M., Gratton, E. & Fantini, S. (2000). On-line optical imaging of the human brain with 160-ms temporal resolution, *Optics Express*, **6**, 49-57.
- Fukui, Y., Ajichi, Y. & Okada E. (2003). Monte Carlo Prediction of Near-Infrared Light Propagation in Realistic Adult and Neonatal Head Models. *Applied Optics*, **42**, 2881-2887.
- Furuya, I., & Mori, K. (2003). Cerebral lateralization in spoken language processing measured by multi-channel near-infrared spectroscopy (NIRS). *Brain and Nerve*, **55**, 226-231.
- Goebel, R., Khorram-Sefat, D., Muckli, L., Hacker, H., & Singer, W. (1998). The constructive nature of vision: direct evidence from functional magnetic resonance imaging studies of apparent motion and motion imagery. *European Journal of Neuroscience*, **10**, 1563-1573.

- Gottlieb, G. (1992). *Individual Development and Evolution: The Genesis of Novel Behavior*. New York: Oxford University Press.
- Gratton, G., Corballis, P.M., Cho, E., Fabiani, M. & Hood, D.C. (1995). Shades of grey matter: non-invasive optical images of human brain responses during visual stimulation. *Psychophysiology*, **32**, 505-509.
- Gratton, E., Toronov, V., Wolf, U., Wolf, M., & Webb, A. (2005). Measurement of brain activity by near-infrared light. *Journal of Biomedical Optics*, **10**, 011,008.
- Grill-Spector, K., Golarai, G. & Gabrieli, J. (2008). Developmental neuroimaging of the human ventral visual cortex. *Trends in cognitive sciences*, **12**, 152-162.
- Grossmann, T. (2008). Shedding light on infant brain function: The use of near-infrared spectroscopy (NIRS) in the study of face perception. *Acta Paediatrica*, **97**, 1156-1158.
- Grossmann, T., & Johnson, M. H. (2007). The development of the social brain in infancy. *European Journal of Neuroscience*, **25**, 909-919.
- Halit, H., de Haan, M. & Johnson, M. H. (2003) Cortical specialisation for face processing: face-sensitive event-related potential components in 3- and 12- month-old infants. *Neuroimage*, **19**, 1180-1193.
- Hashimoto, T., Minagawa-Kawai, Y. & Kojima, S. (2006). Motion illusion activates the visual motion area of the brain: a Near Infrared Spectroscopy (NIRS) study. *Brain Research*, **1077**, 116-122.
- Heekeren, H. R., Obrig, H., Wenzel, R., Eberle, K., Ruben, J., Villringer, K., Kurth, R. & Villringer, A. (1997). Cerebral haemoglobin oxygenation during sustained visual stimulation--a near-infrared spectroscopy study. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, **352**, 743-750.
- Hock, C., Villringer, K., Müller-Spahn, F., Wenzel, R., Heekeren, H., Schuh-Hofer, S., Hofmann, M., Minoshima, S., Schwaiger, M., Dirnagl, U. & Villringer, A. (1997). Decrease in parietal cerebral hemoglobin oxygenation during performance of a verbal fluency task in patients with Alzheimer's disease monitored by means of near-infrared spectroscopy (NIRS)--correlation with simultaneous rCBF-PET measurements. *Brain*, **755**, 293-303.

- Hoshi, Y. & Tamura, M. (1997). Fluctuations in the cerebral oxygenation state during the resting period in functional mapping studies of the human brain. *Medical & Biological Engineering & Computing*, **35**, 328-330.
- Hoshi, Y. (2003). Functional near-infrared optical imaging: utility and limitations in human brain mapping. *Psychophysiology*, **40**, 511-520.
- Hoshi, Y. & Tamura, M. (1993). Dynamic multichannel near infrared optical imaging of human brain activity. *Journal of Applied Physiology*, **75**, 1842-1846.
- Hoshi, Y., Kohri, S., Matsumoto, Y., Cho, K., Matsuda, T., Okajima, S. & Fujimoto, S. (2000). Hemodynamic responses to photic stimulation in neonates. *Pediatric Neurology*, **23**, 323-327.
- Hoshi, Y., Onoe, H., Watanabe, Y., Andersson, J., Bergström, M., Lilja, A., Langström, B. & Tamura, M. (1994). Non-synchronous behavior of neuronal activity, oxidative metabolism and blood supply during mental tasks in man. *Neurosci Lett.*, **172**, 129-133.
- Jöbsis, F. F. (1977). Noninvasive, infrared monitoring of cerebral and myocardial oxygen sufficiency and circulatory parameters. *Science*, **198**, 1264-1267.
- Johnson, M. H. (2001). Functional brain development in humans. *Nature Reviews Neuroscience*, **2**, 475-483.
- Johnson, M.H. (2000). Cortical specialization in infants: Beyond the maturational model. *Brain and Cognition*, **42**, 124-127.
- Kanwisher, N., Chun, M .M., McDermott, J. & Ledden, P. (1996). Functional Imaging of Human Visual Recognition. *Cognitive Brain Research*, **5**, 55-67.
- Karen, T., Morren, G., Haensse, D., Bauschatz, A. S., Bucher, H. U. & Wolf, M. (2007). Hemodynamic response to visual stimulation in newborn infants using functional near-infrared spectroscopy. *Human Brain Mapping*, **29**, 453-460.
- Kato, T., Kamei, A., Takashima, S. & Ozaki, T. (1993). Human visual cortical function during photic stimulation monitored by means of near-infrared spectroscopy. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, **13**, 516-520.

- Kennan R., Kim, D., Maki, A., Koizumi, H., & Constable, R. (2002). Non-Invasive Assessment of Language Lateralization by Transcranial Near Infrared Optical Topography and Functional MRI. *Human Brain Mapping*, **16**,183-189.
- Kissack, C.M., Garr R., Wardle, S.P. & Weindling, A.M. (2005). Cerebral fractional oxygen extraction is inversely correlated with oxygen delivery in the sick, newborn, preterm infant. *Journal of Cereb Blood Flow and Metabolism*, **25**(5), 545-553.
- Krolak-Salmon, P., Henaff, M. A., Vighetto, A., Bertrand, O. & Mauguiere, F. (2004). Early amygdala reaction to fear spreading in occipital, temporal, and frontal cortex: a depth electrode ERP study in human. *Neuron*, **42**, 665-676.
- Lewin, J. S., Friedman, L. & Wu, D. (1996). Cortical localization of human sustained attention: detection with functional MR using a vigilance paradigm. *Journal of computer assisted tomography*, **20**, 695-701.
- Liu, H., Miwa, M., Beauvoit, B., Wang, N. G. & Chance, B. (1993). Characterization of absorption and scattering properties of small volume biological samples using time-resolved spectroscopy. *Analytical Biochemistry*, **213**, 378-385.
- Lloyd-Fox, S., Blasi, A., Volein, A., Everdell, N., Elwell, C. E. & Johnson, M. H. (2008). Social Perception in Infancy: A near infrared spectroscopy study. *Child Development*. (In press).
- Macchi Cassia, V., Valenza, E. & Simion, F. (2004). Lo sviluppo cognitivo dalle teorie classiche ai nuovi orientamenti. Il Mulino, Bologna.
- Malach, R., Reppas, J., Benson, R., Kwong, K., Jiang, H., Kennedy, W., Ledden, P., Brady, T., Rosen, B., & Tootell, R. (1995). Object-related activity revealed by functional magnetic resonance imaging in human occipital cortex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **92**, 8135-8139.
- Malonek, D. & Grinvald, A. (1996). Interaction between electrical activity and cortical microcirculation revealed by Imaging Spectroscopy: Implication for functional brain mapping. *Science*, **272**, 551-554.
- Mazziotta, J. C., Phelps, M. E., Carson, R. E. & Kuhl, D.E. (1982). Topographic mapping of human cerebral metabolism: Auditory stimulation, *Neurology*, **32**, 921-937.

- Meek J., Elwell C.E., McCormick D.C., Townsend C., Edwards A.D., Stewart J.P. & Wyatt J.S. (1999). Abnormal cerebral haemodynamics in perinatally asphyxiated neonates related to outcome. *Archives of Disease in Childhood*, **81**, 110-115.
- Meek, J. (2002). Basic principles of optical imaging and application to the study of infant development. *Developmental Science*, **5**, 371-380.
- Meek, J. H., Elwell, C. E., Khan, M. J., Romaya, J., Wyatt, J. S., Delpy, D. T. & Zeki, S. (1995). Regional changes in cerebral hemodynamics as a result of a visual stimulus measured by near infrared spectroscopy. *Proceedings. Biological sciences / The Royal Society*, **261**, 351–356.
- Meek, J.H., Firbank, M., Elwell, C. E., Atkinson, J., Braddick, O. & Wyatt, J. S. (1998). Regional hemodynamic responses to visual stimulation in awake infants. *Pediatric Research*, **43**, 840-843.
- Mehagnoul-Schipper, D. J., van der Kallen, B., Colier, W. N. J. M., van der Sluijs, M. C., van Erning, L. J. T. O., Thijssen, H., Oeseburg, B., Hoefnagels, W., Jansen, R. (2002). Simultaneous measurements of cerebral oxygenation changes during brain activation by near-infrared spectroscopy and functional magnetic resonance imaging in healthy young and elderly subjects. *Human Brain Mapping*, **16**, 14-23.
- Mendola, J. D., Dale, A. M., Fischl, B., Liu, A. K., & Tootell, R. B. H. (1999). The Representation of Illusory and Real Contours in Human Cortical Visual Areas Revealed by Functional Magnetic Resonance Imaging. *The Journal of Neuroscience*, **19**, 8560-8572.
- Minagawa-Kawai, Y., Mori, K., Furuya, I., Hayashi, R., & Sato, Y. (2002). Assessing cerebral representations of short and long vowel categories by NIRS. *NeuroReport*, **13**, 581-584.
- Minagawa-Kawai, Y., Mori, K., Hebden, J. C. & Dupoux, E. (2007). Optical imaging of infants' neurocognitive development: recent advances and perspectives. *Developmental Neurobiology*, **68**, 712-728.
- Mosconi, M. W., Mack, P. B., McCarthy, G. & Pelphrey, K. A. (2005). Taking an “intentional stance” on eye-gaze shifts: A functional neuroimaging study of social perception in children. *NeuroImage*, **27**, 247-252.
- Nakato, E., Otsuka, Y., Kanazawa, S., Yamaguchi, M. K., Watanabe, S. & Kakigi R. (2007). When do infants differentiate profile face from frontal face? A near-infrared spectroscopic study. *Human Brain Mapping*. [Epub ahead of print].

- Otsuka, Y., Nakato, E., Kanazawa, S., Yamaguchi, M. Y., Watanabe, S., & Kakigi, R. (2007). Neural activation to upright and inverted faces in infants measured by near infrared spectroscopy, *NeuroImage*, **34**, 399-406.
- Passarotti, A. M., Paul, B. M., Bussiere, J. R., Buxton, R.B. Wong, C. & Stiles, J. (2003). The development of face and location processing: an fMRI study. *Developmental Science*, **6**, 100-117.
- Pelphrey, K. A., Morris, J. P. Michelich, C. R., Allison, T. & McCarthy, G. (2005). Functional Anatomy of Biological Motion Perception in Posterior Temporal Cortex: An fMRI Study of Eye, Mouth and Hand Movements. *Cerebral Cortex*, **15**, 1866-1876.
- Piaget, J. (1967/1971). *Biology and knowledge: An essay on the relation between organic regulations and cognitive processes*. Chicago: University of Chicago Press.
- Piaget, J. (1967/1971). *Biology and knowledge*. Chicago: University of Chicago Press.
- Platel, H., Price, C., Baron, J. C., Wise, R., Lambert, J., Frackowiak, R. S., Lechevalier, B. & Eustache, F. (1997). The structural components of music perception. A functional anatomical study. *Brain*, **120**, 229-243.
- Puce, A., Allison, T., Asgari, M., Gore, J. C., & McCarthy, G. (1996). Differential sensitivity of human visual cortex to faces, letterstrings, and textures: a functional MRI study. *Journal of Neuroscience*, **16**, 5205-5215.
- Quaresima, V., Ferrari, M., Torricelli, A., Spinelli, L., Pifferi, A. & Cubeddu, R.(2005). Bilateral prefrontal cortex oxygenation responses to a verbal fluency task: a multichannel time-resolved near-infrared topography study. *Journal of Biomedical Optics*, **10**, 11012.
- Sakatani, K., Chen, S., Lichty, W., Zuo, H., & Wang, Y. (1999). Cerebral blood oxygenation changes induced by auditory stimulation in newborn infants measured by near infrared spectroscopy. *Early Human Development*, **55**, 229-236.
- Sato, Y., Mori, K., Furuya, I., Hayashi, R., Minagawa-Kawai, Y. and Koizumi, T. (2003). Developmental changes in cerebral lateralization to spoken language in infants: measured by near-infrared spectroscopy. *The Japan Journal of Logopedics and Phoniatrics*, **44**, 165-171.



- Senior, C., Barnes, J., Giampietro, V., Simmons, A., Bullmore, E.T., Brammer, M. & David, A. S. (2000). The functional neuroanatomy of implicit-motion perception or 'representational momentum'. *Current Opinion in Neurobiology*, **10**, 16-22.
- Sergent, J. & Signoret, J. L. (1992). Functional and anatomical decomposition of face processing: evidence from prosopagnosia and PET study of normal subjects. *Philosophical transactions of the Royal Society B*, **335**, 55-61.
- Sergent, J., Ohta, S., & MacDonald, B. (1992). Functional neuroanatomy of face and object processing: a positron tomography study. *Brain*, **115**, 15-36.
- Sobel, N., Prabhakaran, V., Desmond, J. E., Glover, G. H., Sullivan, E. V., & Gabrieli, J. D. E. (1997). A method for functional magnetic resonance imaging of olfaction. *J. Neuroscience Methods*, **78**, 115-123.
- Spiegel, J., Hansen, C. & Treede, R. D. (1996). Laser-evoked potentials after painful hand and foot stimulation in humans: evidence for generation of the middle-latency component in the secondary somatosensory cortex. *Neuroscience Letter*, **216**, 179-182.
- Stankovic, M. R., Maulik, D., Rosenfeld, W., Stubblefield, P. G., Kofinas, A. D., Drexler, S., Nair, R., Franceschini, M. A., Hueber, D., Gratton, E. & Fantini, S. (1999). Real-time optical imaging of experimental brain ischemia and hemorrhage in neonatal piglets. *Journal of Perinatal Medicine*, **27**, 279-286.
- Strangman, G., Boas, D. A. & Sutton, J. P. (2002). Non-invasive neuroimaging using near-infrared light. *Biological Psychiatry*, **52**, 679-693.
- Strangman, G., Culver, J. P., Thompson, J. H., Boas, D. A. (2002). A quantitative comparison of simultaneous BOLD fMRI and NIRS recordings during functional brain activation. *NeuroImage*, **17**, 719-731.
- Sunaert, S., Van Heck, P., Marchal, G., & Orban G. A. (1999). Motion-responsive regions of the human brain. *Experimental Brain research*, **127**, 355-370.
- Taga, G., Asakawa, K., Hirasawa, K. & Konishi, Y. (2003). Hemodynamic responses to visual stimulation in occipital and frontal cortex of newborn infants: a near-infrared optical topography study. *Early Human Development*, **75**, S203-S210.

- Taga, G., Asakawa, K., Maki, A., Konishi, Y. & Koizumi, H. (2003). Brain imaging in awake infants by near-infrared optical topography. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **16**, 10722-10727.
- Tootell, R. B. H., Tsao, D. & Vanduffel, W. (2003). Neuroimaging Weighs In: Humans Meet Macaques in "Primate" Visual Cortex. *The Journal of Neuroscience*, **23**, 3981-3989.
- Toronov, V., Franceschini, M. A., Filiaci, M., Fantini, S., Wolf, M., Michalos, A. & Gratton, E. (2000). Near-infrared study of fluctuations in cerebral hemodynamics during rest and motor stimulation: Temporal analysis and spatial mapping, *Medical Physics*, **27**, 801-815.
- Toronov, V., Webb, A., Choi, J. H., Wolf, M., Michalos, A. Gratton, E. & Hueber, D. (2001). Investigation of human brain hemodynamics by simultaneous near-infrared spectroscopy and functional magnetic resonance imaging. *Medical Physics*, **28**, 521-527.
- Toronov, V., Webb, A., Choi, J. H., Wolf, M., Safonova, L., Wolf, U. & Gratton, E. (2001). Study of Local Cerebral Hemodynamic Fluctuations by Simultaneous Frequency-Domain near-infrared spectroscopy and fMRI. *Optics Express*, **9**, 417-427.
- Vaina, L. M., Solomon, J., Chowdhury, S., Sinha, P. & Belliveau, J. W. (2001). Functional neuroanatomy of biological motion perception in humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, **98**, 11656-11661.
- Van der Zee, P., Essenpreis, M & Delpy, D. T. (1993). Optical properties of brain tissue. *Photon Migration and Imaging in Random Media and Tissues*, R. R. Alfano and B. Chance, eds. Proc. 454-465.
- Villringer A. & Chance B. (1997). Non-invasive optical spectroscopy and imaging of human brain function. *Trends Neuroscience*, **20**, 435-442.
- Villringer, A., Planck, J., Hock, C., Schleinkofer, L. & Dirnagl, U. (1993). Near infrared spectroscopy (NIRS): a new tool to study hemodynamic changes during activation of brain function in human adults. *Neuroscience Letters*, **154**, 101-104.
- Villringer, A., Planck, J., Hock, C., Schleinkofer, L. & Dirnagl, U. (1993). Near infrared spectroscopy (NIRS): a new tool to study hemodynamic changes during activation of brain function in human adults. *Neuroscience Letters*, **154**, 101-104.

- Watanabe, H., Homae, F., Nakano, T. & Taga, G. (2008). Functional activation of diverse regions of the developing brain of the human infants. *NeuroImage*, **43**, 346-357.
- Wolf M., Wolf U., Toronov V., Michalos A., Paunescu L.A., Choi J.H. & Gratton E. (2002). Different time evolution of Oxyhemoglobin and Deoxyhemoglobin concentration changes in Visual and Motor Cortices during functional stimulation: a Near Infrared Spectroscopy Study. *NeuroImage*, **16**, pp.704-712.
- Wolfberg, A. J. & du Plessis, A. J. (2006). Near-infrared spectroscopy in the fetus and neonate. *Clinics in perinatology*, **33**, 707-728.
- Wyatt J.S., Delpy D.T., Cope M., Richardson C.E., Edwards A.D., Wray S. & Reynolds O.R. (1990). Quantification of cerebral blood volume in newborn human infants by near infrared spectroscopy. *J. Appl. Physiology*, **68**, 1086-1091.
- Wyatt J.S., Delpy D.T., Cope M., Wray S. & Reynolds O.R. (1986). Quantification of cerebral oxygenation and hemodynamics in sick newborn infants by near infrared spectroscopy. *Lancet*, **2** (8515), 1063-1066.
- Wyatt, J.S., Cope, M., Delpy, D.T., Wray, S., & Reynolds, E.O.R. (1986). Quantification of cerebral oxygenation and haemodynamics in sick newborn infants by near infrared spectrophotometry. *Lancet*, **2**, 1063-1066.
- Yamashita, Y., Oda, M., Ohmae, E. & Tamura, M. (1998). Continuous measurement of oxy- and deoxyhemoglobin of piglet brain by time-resolved spectroscopy. *Biomedical Optical Spectroscopy and Diagnostics*, **22**, 205-207.
- Yoxall C.W., Weindling A.M., Dawani N.H. & Peart I. (1995). Measurement of cerebral venous oxyhemoglobin saturation in children by near infrared spectroscopy and partial jugular venous occlusion. *Pediatric Research*, **38**(3), 319-323.
- Zang G., Katz A., Alfano R.R., Kofinas D.D., Stubblefields P.G., Rosenfeld W., Beyer D., Maulik D. & Stankovic S. (2000). Brain perfusion monitoring with frequency-domain and continuous-wave near-infrared spectroscopy: a cross correlation study in newborn piglets. *Phys. Med. Biol.*, **45**, 3143-3158.

Zaramella, P., Freato, F., Amigoni, A., Salvadori, S., Marangoni, P., Supppei, A., Schiavo, B. & Chiandetti, L. (2001). Brain auditory activation measured by near-infrared spectroscopy (NIRS) in neonates, *Pediatric Research*, **49**, 213-219.

Zeki, SM. (1974). Functional organization of a visual area in the posterior bank of the superior temporal sulcus of the rhesus monkey. *The Journal of Physiology*, **236**, 549-573.

Zhang, Q., Ma, H., Nioka, S., Chance, B., (2000). Study of near infrared technology for intracranial hematoma detection. *Journal of Biomedical Optics*, **5**, 206-213.