

POLITECNICO DI TORINO



Corso di laurea Magistrale in Ingegneria Biomedica

Validazione dispositivi NIRS: analisi stato dell'arte ed applicazione su prototipo.

Relatore:

prof. Marco Knaflitz

Correlatori:

prof.ssa Valentina Agostini

ing. Marco Ghislieri

Candidato:

Claudio Ambrosecchia

a.a. 2020/2021

Dedicato a

Ai miei genitori, mio fratello e i miei nonni, che mi hanno sempre supportato dandomi costantemente la carica per andare avanti.

Il loro amore è tutto.

A Federica che ogni giorno mi rende felice.

A tutti coloro che in questi anni mi sono stati vicino.

Grazie

Abstract

L'ambito del neuroimaging funzionale è in continua crescita, grazie allo sviluppo di nuove tecnologie utili alla comprensione dell'accoppiamento neuro-vascolare. La spettroscopia nel vicino infrarosso funzionale (*fNIRS*) è una tecnica di indagine non invasiva ed a basso rischio per il soggetto tramite la quale viene effettuata l'analisi delle variazioni emodinamiche indotte da stimoli esterni. La mancata standardizzazione di un metodo di acquisizione dei segnali su soggetto, come successivamente anche l'analisi e l'interpretazione dei dati, sono oggetto di numerosi studi che mirano a quantificare le differenze tra i dispositivi NIRS attualmente in commercio al fine di uniformarne la risposta. La validazione di un prototipo di dispositivo NIRS richiederebbe o l'utilizzo di un fantoccio simulante le caratteristiche ottiche della testa umana o il confronto diretto con un dispositivo attualmente in commercio. Sono state analizzate alcune soluzioni di fantoccio, al fine di comprenderne la struttura ed il funzionamento, effettuando inoltre un'analisi SWOT. La seconda parte dell'elaborato si sofferma sulla progettazione di un protocollo di acquisizione di segnali NIRS sulla corteccia prefrontale durante task di apnea espiratoria. Viene poi effettuata una simulazione di comparazione tra dispositivo commerciale e prototipo NIRS al fine di valutare un algoritmo di *k*-means per la classificazione dei dati ottenuti. L'algoritmo non rileva evidenti differenze tra i dati elaborati, confermando sia l'omogeneità delle acquisizioni, sia l'utilità di tale approccio nella comparazione dei dispositivi.

Indice

Introduzione e scopo della tesi	4
Capitolo 1: Spettroscopia nel vicino infrarosso	6
1.1 Autoregolazione cerebrale	6
1.2 NIRS	9
1.3 Modello matematico	11
1.4 Tecniche NIRS	13
1.4.1 Continuous wave.....	13
1.4.2 Frequency domain	14
1.4.3 Time domain	14
1.4.4 Spettroscopia spazialmente risolta.....	15
Capitolo 2: Storia e stato dell'arte del NIRS.....	17
2.1 Storia e stato dell'arte	17
2.2 NIRO-200NX	19
2.3 Prototipo di dispositivo NIRS.....	20
2.4 Elementi essenziali per la richiesta di valutazione delle indagini cliniche con dispositivi medici.....	22
2.5 Metodi di Validazione	23
Capitolo 3: Fantocci di calibrazione	26
3.1 Introduzione ai fantocci di calibrazione	26
3.2 Fantocci solidi	27
3.2.1 Fantoccio multilayer Izzetoglu et al.....	27
3.2.2 Fantoccio Zhang et al.....	29
3.3 Fantocci liquidi	32
3.3.1 Fantoccio Suzuki et al.	32
3.3.2 Fantoccio Isler et al.	34
3.3.3 Fantoccio Sorensen et al.....	38
3.3.4 Fantoccio Kleiser et al.....	41
3.4 Analisi SWOT	45
3.5 Considerazioni finali fantocci di calibrazione.....	46
Capitolo 4 : Metodo di confronto	48
4.1 Confronto tra dispositivi.....	48
4.2 Protocollo di acquisizione segnali.....	49
4.3 Metodologia analisi dei segnali.....	52
4.3.1 Preprocessing	53
4.3.2 K-means	56

4.4	Risultati	57
4.4.1	dataset in input: dataset totale	57
4.4.2	dataset in input: singoli cromofori	61
4.5	Considerazioni finali metodo del confronto	65
Conclusioni	67
Appendice	68
	Protocollo di validazione strumento NIRS per confronto con NIRO-200NX	68
	Scheda NIRS	70
Bibliografia	72

Introduzione e scopo della tesi

Il lavoro svolto ha lo scopo di illustrare quali siano gli aspetti principali ed il funzionamento della spettroscopia nel vicino infrarosso (NIRS) nell'ambito del neuroimaging funzionale, cercando di approfondire quali siano i metodi di validazione di un dispositivo medico che si basa sull'utilizzo di questa tecnologia. L'fNIRS (spettroscopia nel vicino infrarosso funzionale) consente di misurare il metabolismo cerebrale analizzando in tempo reale quali siano i processi che governano specifiche aree e specifiche funzioni cerebrali.

Questa tecnica non invasiva si basa sull'utilizzo della luce a specifiche lunghezze d'onda appartenenti al vicino infrarosso, misurando le variazioni emodinamiche appartenenti al tessuto cerebrale avvenute in risposta ad uno stimolo esterno. Gli attori che regolano queste risposte emodinamiche sono l'emoglobina ossigenata e l'emoglobina deossigenata. La registrazione dei segnali avviene attraverso sonde composte da emettitore-ricevitore e da una fascia utile al mantenimento delle sonde in posizione. Il sistema fNIRS ha come pregio la compattezza e la portabilità dei dispositivi; è possibile effettuare task motori che risulterebbero impossibili con qualunque altro tipo di dispositivo di neuroimaging. Di contro, non vi è una standardizzazione dei metodi di acquisizione e soprattutto dei metodi di analisi dei segnali aprendo la strada a numerose soluzioni sia in vivo che in vitro di validazione dei nuovi dispositivi da immettere in commercio. La mancata standardizzazione dei metodi di acquisizione è dovuta all'adattamento dell'organismo agli stimoli esterni, quindi la progettazione e creazione di un fantoccio che presenti risultati stabili nel tempo risulterebbe un passo avanti nella standardizzazione dei processi di acquisizione e calibrazione dei dispositivi.

L'elaborato ha due principali scopi. Il primo consiste nell'analisi di alcuni tipi fantoccio ritenuti interessanti dal punto di vista della realizzazione in laboratorio e dal punto di vista dei risultati ottenuti. Alcuni dei fantocci descritti, sono stati utili per ottenere la dichiarazione di conformità del proprio dispositivo e la messa in vendita. Altri tipi di fantocci, si prefiggono lo scopo di identificare quali siano le differenze tra diversi dispositivi NIRS al fine di uniformarne i risultati e standardizzare gli output ottenuti da dispositivi diversi. Il secondo scopo dell'elaborato è quello di ideare un metodo di validazione di un prototipo di dispositivo NIRS confrontandolo con la soluzione in commercio da Hamamatsu Photonics: il NIRO-200NX. Questo metodo è composto da una fase di iniziale ricerca in letteratura dei task effettuati con dispositivi NIRS utili per definire l'efficacia del dispositivo. È stato ideato un protocollo di acquisizione dei segnali utilizzando il dispositivo di Hamamatsu. Si è proceduto poi a

formalizzare un metodo di analisi e confronto dei segnali tramite un algoritmo di k -means suddividendo in due gruppi i dati ricavati in base alla loro similarità.

I capitoli della tesi sono strutturati nel seguente modo:

1. Capitolo 1 : Vi è inizialmente una sintesi riguardo il meccanismo di autoregolazione cerebrale e la risposta emodinamica derivata da stimoli esterni ed il motivo per cui siano oggetto di studio tramite NIRS. Seguono i principi fisici e matematici che sono alla base del funzionamento dei sistemi NIRS.
2. Capitolo 2 : Tratta lo stato dell'arte e la storia dei dispositivi NIRS, facendo riferimento all'evoluzione subita da questo tipo di analisi nel tempo, arrivando a descrivere quali sono i dispositivi NIRS che saranno oggetto di analisi all'interno dell'elaborato. Segue l'elenco dei documenti da presentare per la richiesta di valutazione di indagine clinica per la validazione di un dispositivo medico. Si conclude con il dividere l'elaborato in due parti in base ai metodi di validazione di un dispositivo NIRS.
3. Capitolo 3 : I fantocci solidi e liquidi vengono discussi in questo capitolo, analizzando prima i materiali, la struttura ed i processi di fabbricazione e di ricerca di alcune soluzioni di interesse in letteratura ed effettuando poi un'analisi SWOT riguardo la realizzazione di un fantoccio in laboratorio.
4. Capitolo 4 : in questo capitolo viene descritta l'ideazione di un protocollo di acquisizione di segnali da dispositivo NIRS da attuare in laboratorio su 3 soggetti umani e l'analisi dei dati ricavati, fornendo risultati riguardanti l'applicabilità di un algoritmo di k -means per il confronto dei risultati tra dispositivi NIRS diversi.

Capitolo 1: Spettroscopia nel vicino infrarosso

1.1 Autoregolazione cerebrale

Gli organi del corpo umano sono in possesso di un proprio meccanismo di autoregolazione. Il principio di base che regola questo meccanismo è la possibilità di immagazzinare nutrienti ed utilizzarli in caso di carenza, oppure espellerli quando vi è un eccesso. Il cervello non ha la possibilità di immagazzinare scorte di ossigeno e glutammato, perché, ad esempio, un'elevata quantità di ossigeno può ossidare ed intaccare le membrane cellulari neuronali, mentre un eccesso di glutammato potrebbe disidratare i tessuti neuronali. D'altra parte, una carenza di ossigeno nei tessuti cerebrali porterebbe alla morte delle cellule neuronali. Quindi il cervello sfrutta il meccanismo noto come autoregolazione cerebrale per non rimanere in carenza di nutrienti.

Il *Cerebral Blood Flow* (CBF) o *flusso sanguigno cerebrale* è la quantità di sangue fornita al cervello per il suo funzionamento corretto e dipende dalla richiesta metabolica. È determinato da diversi fattori tra cui il più significativo è la Pressione di Perfusione Cerebrale (CPP) che regola la distribuzione di ossigeno nel cervello ed è definita come la differenza di pressione tra il flusso ematico in ingresso (pressione arteriosa ABP) e quello in uscita (pressione intracranica ICP).

Andando a graficare l'andamento del CBF rispetto alla ABP tramite una curva Flusso-Pressione, come in Figura 1.1, è possibile notare che all'interno di un intervallo preciso di pressione il flusso ematico rimane pressoché invariato, questo perché l'autoregolazione cerebrale mantiene il flusso ematico cerebrale stabile. Generalmente i limiti inferiori e superiori sono fra i 60 mmHg ed i 140 mmHg.[1]

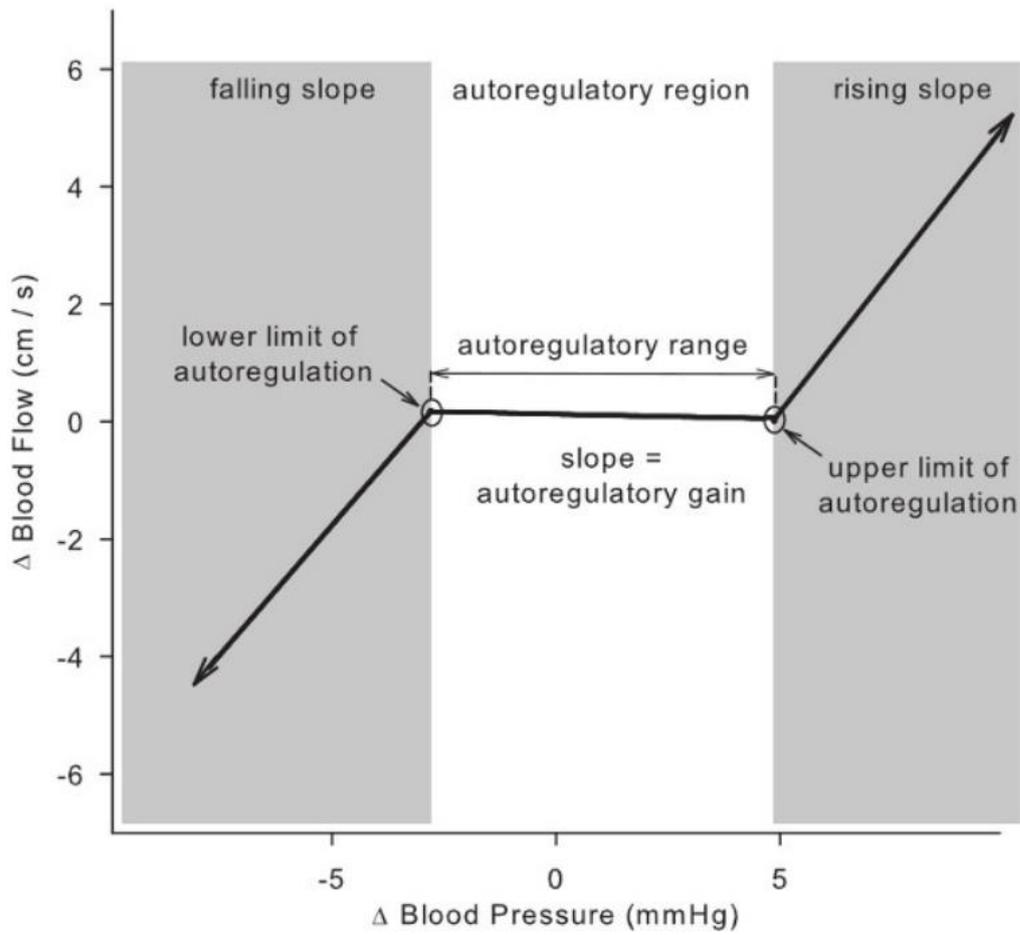


Figura 1.1 Curva Flusso-Pressione. A fronte di cambiamenti della pressione arteriosa, il flusso ematico cerebrale tra i 60 e 140 mmHg rimane costante. Questo è dovuto al meccanismo di autoregolazione.[1]

La pressione che il fluido esercita sulle pareti dei vasi dipende quindi dalla dimensione degli stessi, in particolare dal diametro dei vasi. Per mantenere costante il flusso ematico cerebrale, al variare della pressione, varieranno le dimensioni dei vasi. Quindi, all'aumentare della pressione, il diametro dei vasi diminuisce per aumentare la resistenza in corrispondenza delle pareti. Uno dei meccanismi utilizzati dall'autoregolazione risiede nelle *smooth cells* (figura 1.2), ovvero le cellule della muscolatura liscia, presenti nei rivestimenti dei vasi sanguigni che impongono vasodilatazione o vasocostrizione per aumentare o diminuire la pressione arteriosa. Sono cellule della muscolatura liscia avvolte in una matrice proteica che conferiscono un'elevata capacità di contrazione capace di durare nel tempo per via del basso consumo di ossigeno richiesto.

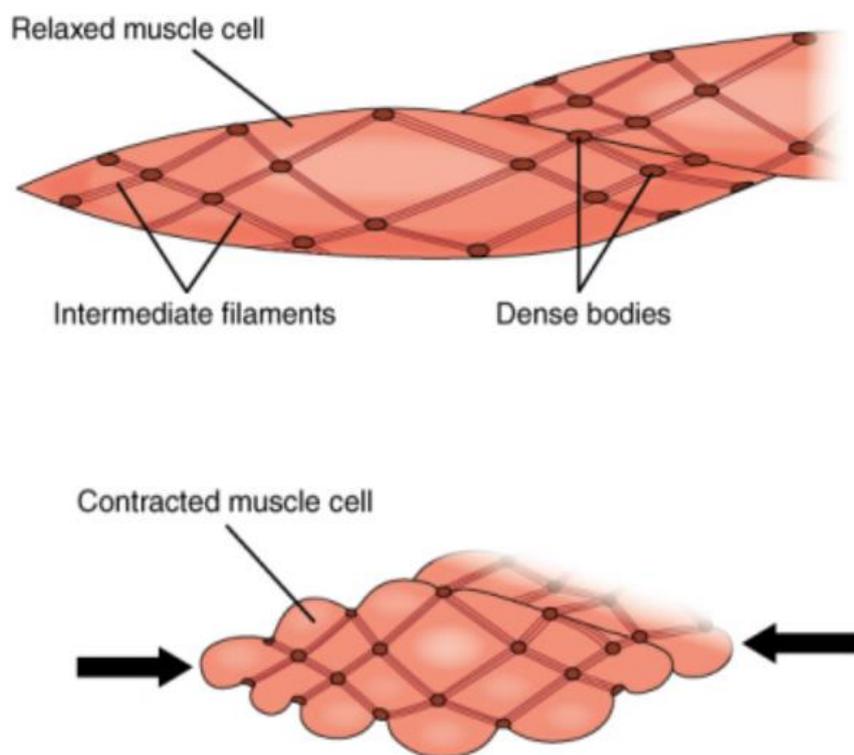


Figura 1.2 Rappresentazione delle cellule della muscolatura liscia. In alto le cellule in conformazione rilassata. In basso è mostrata la conformazione contratta. I filamenti intermedi sono costituiti da actina e miosina tenuti insieme dai corpi densi. Queste proteine sono responsabili della contrazione di questo tessuto muscolare.[2]

L'autoregolazione cerebrale avviene a livello settoriale, in quanto differenti zone cerebrali possono utilizzare o meno questo meccanismo. È possibile forzare una risposta emodinamica tramite un task ed analizzarla per comprendere il livello di ossigenazione della suddetta zona. Ad esempio, tramite task aritmetici, è possibile ottenere una risposta emodinamica evidente nella zona prefrontale dorsolaterale sinistra della corteccia cerebrale. [3] Queste zone, se stimolate, subiranno una vasodilatazione, consentendo un maggior afflusso di ossigeno. Ciò avviene perché la suddetta zona del cervello è maggiormente stimolata dal task e quindi ha bisogno di un maggior afflusso di ossigeno. Lo studio funzionale di questo tipo di risposte emodinamiche settoriali viene effettuato tramite NIRS, il quale analizzando i cambiamenti di concentrazione di emoglobina all'interno della sezione cerebrale indagata è in grado di risalire all'attivazione o meno del meccanismo di autoregolazione.

1.2 NIRS

L'analisi e lo studio del cervello umano può essere effettuato tramite strumenti e metodi diversi, a seconda del tipo di studio da effettuare. È possibile analizzarne l'attività elettrica tramite elettrofisiologia EEG oppure effettuare uno studio della componente emodinamica e funzionale tramite fMRI e PET, che sono strumenti di imaging di elevata complessità, costo ed utilizzo. Uno dei metodi di analisi più studiati ultimamente per la sua elevata risoluzione temporale, portabilità, economicità e sicurezza nell'uso su paziente è quello della spettroscopia nel vicino infrarosso (NIRS).

Questa viene definita tecnica attiva e non invasiva, perché si basa sull'utilizzo di una sorgente luminosa esterna nel vicino infrarosso, posta sulla pelle, caratterizzata da una lunghezza d'onda (λ) tra i 650 nm ed i 950 nm. La scatola cranica risulta trasparente a queste lunghezze d'onda, mentre i tessuti molli ed i cromofori (tra cui l'emoglobina nella sua forma ossidata o ridotta) dispersi nel tessuto sanguigno sono in grado di assorbire parte di questa radiazione luminosa. L'emoglobina ossigenata (O_2Hb), che in figura 1.3 rappresentiamo in rosso, ha il picco dello spettro di assorbimento intorno a λ 850-900 nm. Quella legata all'anidride carbonica chiamata emoglobina ridotta o deossigenata (Hbb), sarà indicata in blu in figura 1.3 con picco dello spettro di assorbimento λ 650-750 nm. È possibile distinguere con accuratezza i due tipi di emoglobina perché hanno picchi di assorbimento a lunghezze d'onda ben distinguibili.

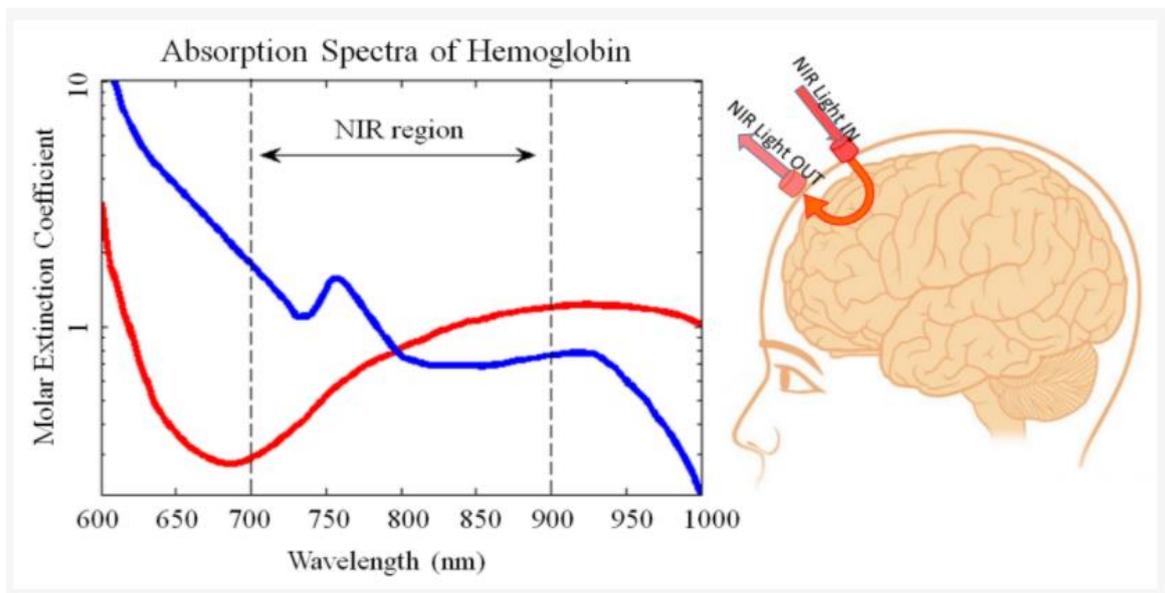


Figura 1.3 Spettro di assorbimento dell'emoglobina ossigenata (in rosso) e dell'emoglobina deossigenata (in blu). Il punto di intersezione dei due spettri è definito punto isosbastico.[4]

La bassa potenza utilizzata rende del tutto sicura questa tecnica per il soggetto analizzato. L'onda luminosa emessa dalla sorgente ad una determinata lunghezza d'onda, viene assorbita in parte dal cromoforo con spettro di assorbimento coerente con quella λ giungendo in forma attenuata al fotorilevatore. L'onda luminosa attraversa i cinque principali tessuti della testa umana: scalpo, cranio, liquido cerebrospinale, materia grigia e materia bianca. La luce dovrà quindi attraversare diversi strati del mezzo subendo fenomeni di assorbimento e di scattering prima di giungere al fotorilevatore ed essere quantizzata. Tramite questo metodo non invasivo siamo in grado di studiare il meccanismo di autoregolazione cerebrale e di verificare la risposta delle diverse zone del cervello a determinati stimoli quali apnea, task mnemonici o aritmetici e motori(figura 1.4). [5]

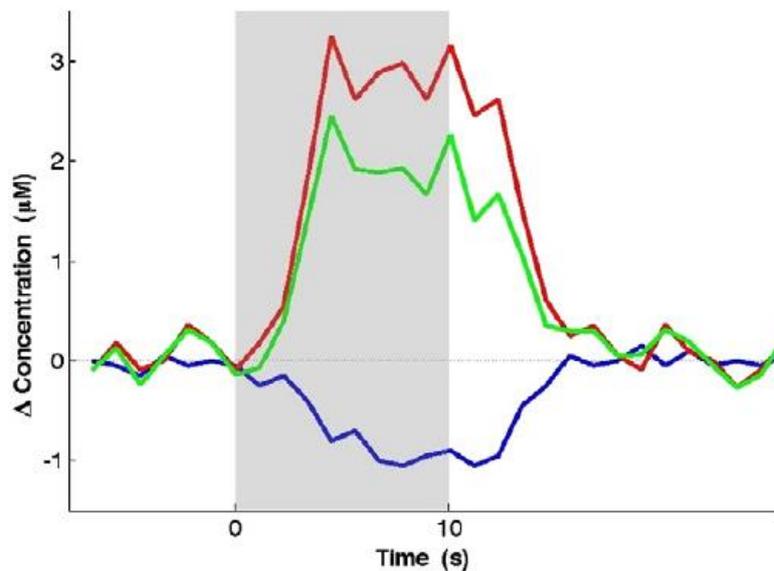


Figura 1.4 Grafico qualitativo di una generica risposta emodinamica dovuta ad attivazione corticale rivelata tramite NIRS. Durante un task cognitivo, l'emoglobina ossigenata (in rosso) tende ad aumentare. La diminuzione dell'emoglobina deossigenata(in blu) è dovuta ad una vasodilatazione che inoltre incrementa l'apporto emoglobina totale (in verde) al cervello.[5]

La sorgente o emettitore, consiste in un diodo ad emissione di luce (LED) o ad un diodo laser (LD) posizionato sullo scalpo che emette un campo elettromagnetico nel vicino infrarosso. Un fotorilevatore con elevata sensibilità, posizionato a pochi centimetri dall'emettitore, rileva l'onda luminosa non assorbita dal mezzo. L'onda luminosa emessa dalla sorgente, penetra gli strati della testa (in ordine dall'esterno all'interno: scalpo, cranio, liquido cerebrospinale, materia grigia, materia bianca) per una profondità di circa 2 o 3 cm a seconda della distanza tra emettitore e ricevitore. Ad una distanza tra sonde minore, corrisponde una profondità dell'onda

minore e quindi un'indagine degli strati extra-cerebrali più esterni, poco rilevanti nell'analisi emodinamica. È raccomandato utilizzare una distanza tra emettitore e fotorilevatore compresa tra i 2,5 cm ed i 4 cm. Le misurazioni sono effettuate tramite una o più coppie di sonde posizionate in base al settore del cervello da indagare.

Non solo l'emoglobina nelle sue due forme contribuisce all'assorbimento ed allo scattering della luce, ma anche l'acqua, i grassi e le proteine presenti lungo il percorso ottico. Attraversato il tessuto, la radiazione uscente dovrebbe ritrovarsi al lato opposto della sorgente, ma per via del forte scattering, i fotoni vengono deviati in tutte le direzioni seguendo un percorso a forma di banana, giungendo in buona parte sul fotorilevatore posto sul cuoio capelluto.[6]

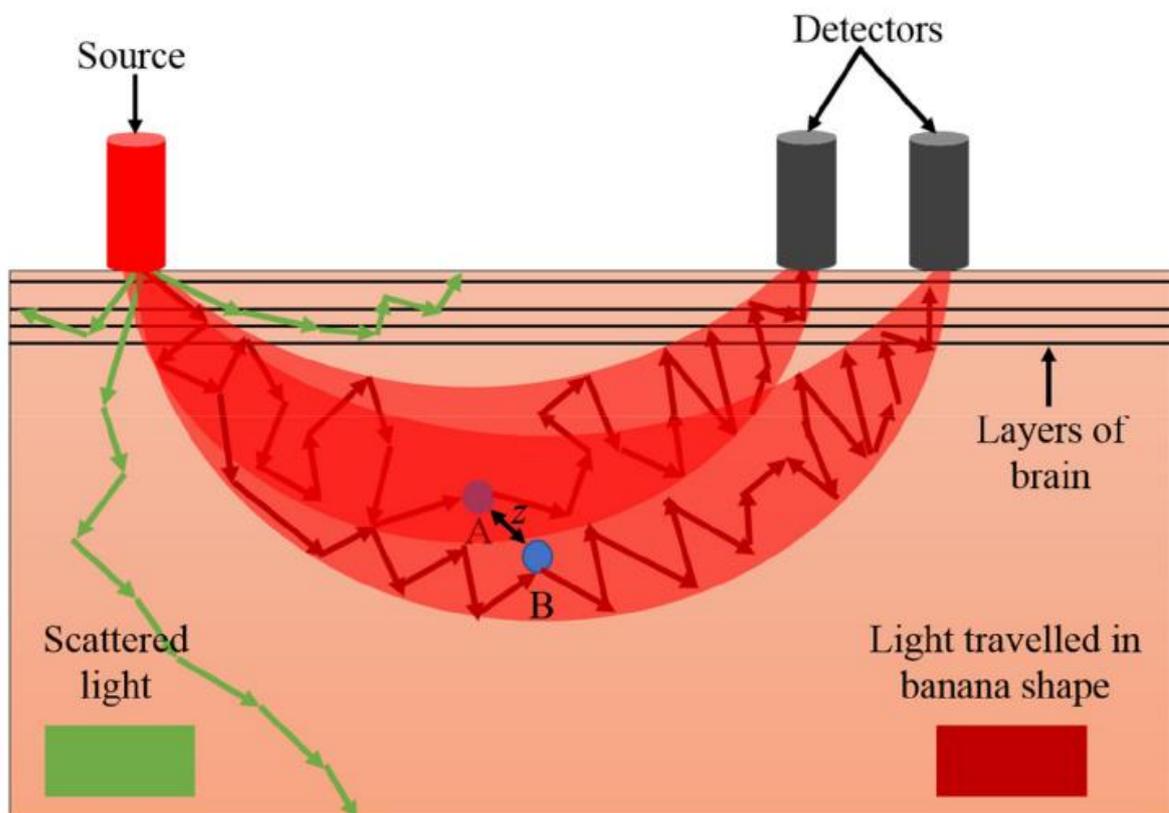


Figura 1.5 la superficie della testa viene irradiata da fotoni a determinate lunghezze d'onda che seguiranno un profilo a forma di banana per via dei fenomeni di assorbimento e di scattering, giungendo al fotorilevatore/i in forma attenuata. [6]

1.3 Modello matematico

Il modello matematico utilizzato segue la legge di Lambert-Beer (1) che identifica un rapporto direttamente proporzionale tra assorbanza e la concentrazione dei cromofori ad una determinata lunghezza d'onda :

$$A = \ln\left(\frac{I_0}{I}\right) = \mu \cdot d = \alpha \cdot c \cdot d$$

Equazione 1

Dove “A” corrisponde alla densità ottica, “I₀” corrisponde alla luce trasmessa, “I” corrisponde alla luce incidente, “α” è definito coefficiente di assorbimento (μM⁻¹ cm⁻¹), “c” è la concentrazione di cromoforo (μM) e “d” è la distanza tra emettitore e ricevitore (cm).

La concentrazione del cromoforo è legata al flusso ematico, quindi se è presente in maggiore quantità ci si può aspettare un assorbimento di energia maggiore. I fotoni, nel mezzo, sono soggetti ad assorbimento e a scattering. È proprio lo scattering che permette ai fotoni di raggiungere il fotorilevatore, ma comporta che possano esserci anche perdite di radiazione luminosa o fotoni che raggiungono il fotorilevatore senza incorrere ad ostacoli (fotoni balistici). Per questo motivo il segnale NIRS possiede una limitata risoluzione spaziale, ma un elevato contrasto, perché una diminuzione di intensità luminosa si tradurrà in una variazione sostanziale sul fotorilevatore. [7]

Considerando il caso reale dovremo correggere la legge di Lambert-Beer (1) per tenere conto delle perdite e delle diverse distanze percorse dai fotoni. Aggiungiamo quindi un fattore “B” chiamato *differential pathlength factor* che prende in considerazione i fotoni che hanno percorso un cammino più lungo ed è un valore ricavabile in letteratura perché standard per alcuni tessuti. Inoltre consideriamo anche i fotoni persi aggiungendo un fattore di attenuazione “G” che è un fattore puramente geometrico. Otteniamo quindi la legge di Lambert-Beer modificata (MBLL) (2):

$$A = \alpha \cdot c \cdot (d \cdot B) + G$$

Equazione 2

dove circa l’80% dell’attenuazione è dovuta proprio a G e non è misurabile perché determinato dalla microstruttura attraversata. Per risolvere l’equazione (2) ricavo il valore di ΔA supponendo che tra due misurazioni diverse non cambi la geometria della struttura, perché non varierà la posizione delle sonde:

$$\Delta A = \alpha \cdot \Delta c \cdot (d \cdot B)$$

Equazione 3

Dalla quale (3) ricaviamo la differenza di concentrazione relativa di cromoforo (4):

$$\Delta c = \frac{\Delta A}{\alpha \cdot d \cdot B}$$

Equazione 4

Da questa relazione, volendo ottenere entrambi i cromofori, possiamo ricavare $\Delta c^{[O_2Hb]}$ e $\Delta c^{[HHb]}$ in un sistema a due equazioni in due incognite (5):

$$\begin{cases} \Delta A_{\lambda_1} = \alpha_{\lambda_1}^{O_2Hb} \cdot \Delta c^{O_2Hb} \cdot d \cdot B + \alpha_{\lambda_1}^{HHb} \cdot \Delta c^{HHb} \cdot d \cdot B \\ \Delta A_{\lambda_2} = \alpha_{\lambda_2}^{O_2Hb} \cdot \Delta c^{O_2Hb} \cdot d \cdot B + \alpha_{\lambda_2}^{HHb} \cdot \Delta c^{HHb} \cdot d \cdot B \end{cases}$$

Equazione 5

1.4 Tecniche NIRS

1.4.1 Continuous wave

La tecnica “continuous wave” (CW) o ad “onda continua” è la prima tecnica che andremo ad analizzare per via della relativa semplicità di realizzazione e costo contenuto. Questo la rende una delle tecniche tuttora più utilizzate nell’ambito delle neuroscienze. Questa tecnica si basa sul principio di attenuazione dell’onda emessa tramite la legge di Lambert-Beer modificata (2) modificata per ottenere i valori relativi delle concentrazioni. Si emette quindi un’onda con una determinata ampiezza a frequenza costante e si misura l’intensità d’onda attenuata dai tessuti incidenti sul ricevitore. Non è possibile determinare i valori assoluti delle concentrazioni di emoglobina ossigenata e deossigenata né i coefficienti di assorbimento e di scattering.

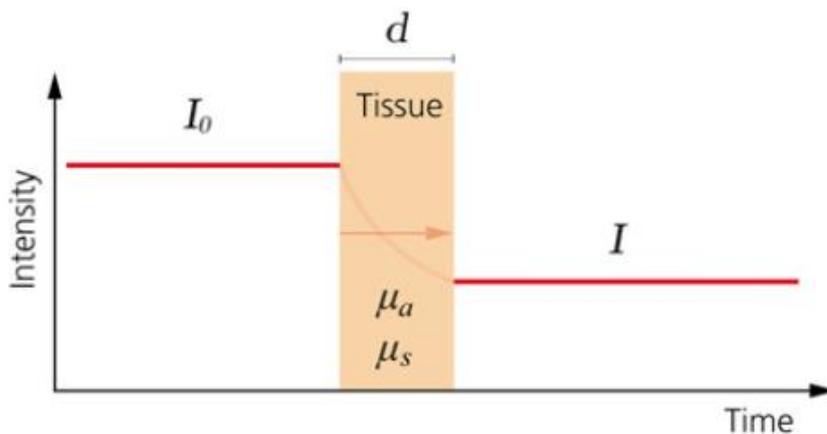


Figura 1.6 Tecnica NIRS CW. I_0 : luce incidente, I : luce trasmessa, d : spessore mezzo, μ_a : coefficiente di assorbimento, μ_s : coefficiente di scattering[5]

1.4.2 Frequency domain

La spettroscopia a modulazione di fase o nel dominio della frequenza (FD) si basa sulla modulazione dell'intensità luminosa emessa su frequenze che vanno dalle decine di Hz alle centinaia di MHz. Tramite quindi la modulazione di fase e la diminuzione in ampiezza avvenuta nel mezzo, è possibile ricavare gli effetti dell'assorbimento e dello scattering del mezzo. Con questa tecnica è possibile ricavare quindi le concentrazioni di cromofori assolute. È una tecnica però più costosa della CW e più complessa dal punto di vista realizzativo.

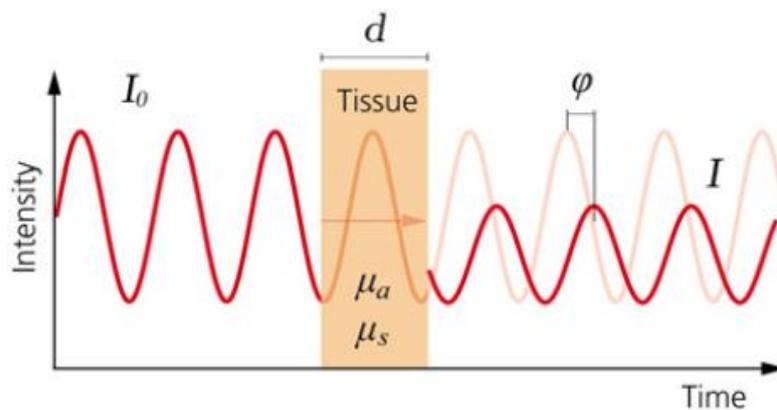


Figura 1.7 Tecnica NIRS FD. I_0 : luce incidente, I : luce trasmessa, d : spessore mezzo, μ_a : coefficiente di assorbimento, μ_s : coefficiente di scattering, φ : ritardo di fase.[5]

1.4.3 Time domain

I sistemi che si basano sulla spettroscopia nel dominio del tempo (TD) impiegano impulsi luminosi della durata nell'ordine dei picosecondi attraverso il tessuto e misurano il tempo di volo della luce emergente dal tessuto. Quindi viene misurato il tempo di volo attraverso il mezzo fornendo informazioni anche sul tessuto irraggiato, quali i coefficienti di assorbimento e scattering, rendendo possibile ricavare i valori assoluti di concentrazione di emoglobina ossigenata e deossigenata. I costi associati a questa tecnica però sono molto più elevati rispetto alla CW.

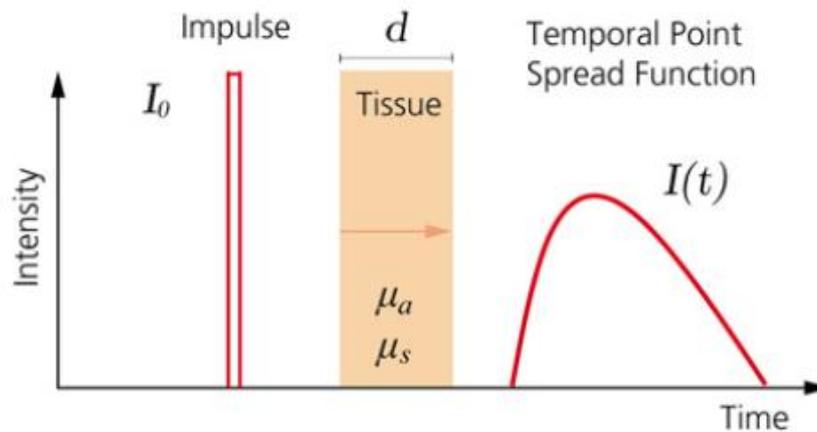


Figura 1.8 Tecnica NIRS TD. I_0 : impulso, $I(t)$: temporal point spread function, d : spessore mezzo, μ_a : coefficiente di assorbimento, μ_s : coefficiente di scattering[8]

1.4.4 Spettroscopia spazialmente risolta

La tecnica in questione viene anche definita come *spettroscopia spazialmente risolta o multi-distanza* (SRS). Utilizza più fotorilevatori che misurano l'intensità luminosa a diverse distanze dalla sorgente (figura 1.9). La distanza tra le sonde quindi rimane invariata per tutte le misurazioni permettendo di analizzare le differenti attenuazioni subite dalla luce a seguito del maggiore percorso. Tramite questo metodo è possibile ricavare il rapporto tra l'emoglobina ossigenata e quella totale ottenendo il grado di saturazione di ossigeno nel tessuto (TOI).

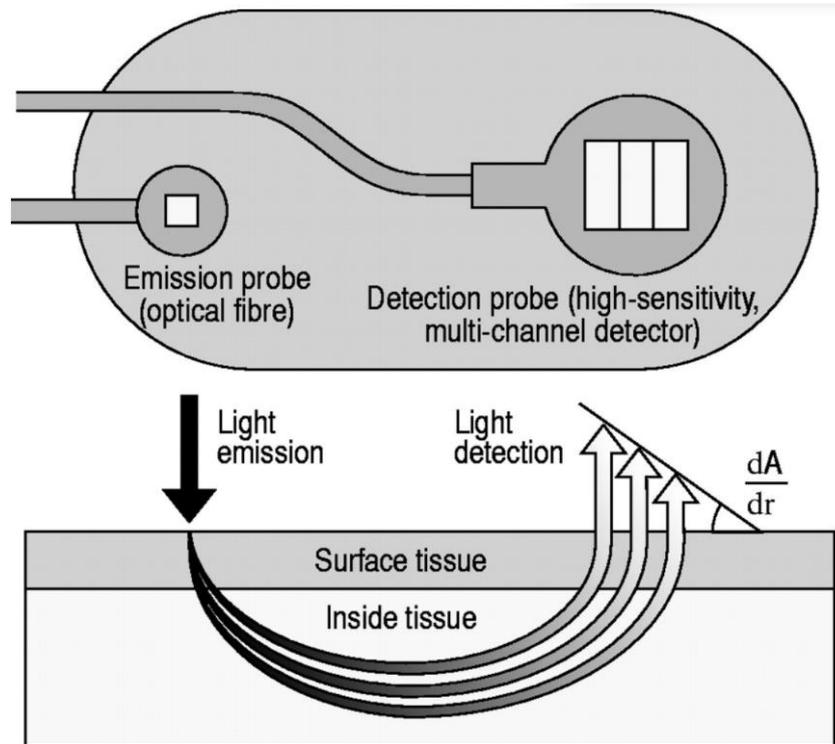


Figura 1.9 Struttura fissa di sonde (emettitore-ricevitore) utilizzate nella tecnica multi-distanza. In basso, rappresentazione grafica dei percorsi di fotoni rilevati dai fotorilevatori. $\delta A/\delta r$ indica il rate di attenuazione di luce rispetto alla distanza[9]

Capitolo 2: Storia e stato dell'arte del NIRS

2.1 Storia e stato dell'arte

In una review dello stato dell'arte della spettroscopia sui tessuti umani del 1991, Chanche [10] informò come erano noti già dagli anni '40 dei metodi ottici utilizzati per l'analisi dell'ossigenazione dei tessuti. Era riconosciuto che le attività cerebrali erano associate a innumerevoli fattori fisiologici. Solo nel 1977, però Jobsis[11]riuscì a dimostrare che i tessuti umani avessero un alto grado di trasparenza nello spettro del NIR, consentendo quindi un'analisi non invasiva dei cambiamenti di ossigenazione delle regioni corticali in adulti soggetti a iperventilazione. Già nel '80 Ferrari utilizzò un prototipo di strumento NIRS per misurare sperimentalmente l'ossigenazione nei tessuti cerebrali negli animali ed in soggetti umani adulti [12]e, nel '85, presentò i primi risultati ottenuti studiando gli effetti della compressione dell'arteria carotidea sull'ossigenazione cerebrale. Lo stesso Jobsis nel '85 utilizzò questa tecnica per lo studio dell'ossigenazione cerebrale di infanti. Tre anni dopo uno dei primi sistemi a quattro lunghezze d'onda fu descritto da Cope and Delpy gettando le basi per il sistema a singolo canale in Continuous Wave (CW) NIRO 1000 (Hamamatsu Photonics) in grado di rilevare le concentrazioni relative dei cromofori. Inoltre, divenne il primo sistema NIRS ad ottenere la certificazione per uso commerciale. Dal 1990 al 1995 gli studi iniziano ad intensificarsi indagando su malattie come i disturbi psichiatrici [13] o nel '93 quando Villringer et al. [14] analizzarono quali fossero i cambiamenti emodinamici durante l'attivazione del cervello tramite stimoli utilizzando la fNIRS (functional Near Infrared Spectroscopy). Dal 2000 si è concentrati sull'affinamento della tecnica e sulla creazione di tecniche di imaging sfruttando un elevato numero di emettitori e ricevitori e che lavorando simultaneamente o in maniera multi-plexata sono in grado di ricostruire una mappa dell'attivazione cerebrale.[15][16]. In parallelo, lo sviluppo di tecniche più complesse come la Frequency domain e la Time domain spectroscopy hanno permesso di poter calcolare i valori assoluti dei cromofori e di affiancare la spettroscopia ad infrarossi alla MRI e alla PET generando una mappatura più completa e a miglior risoluzione del funzionamento della corteccia cerebrale. [17][18]

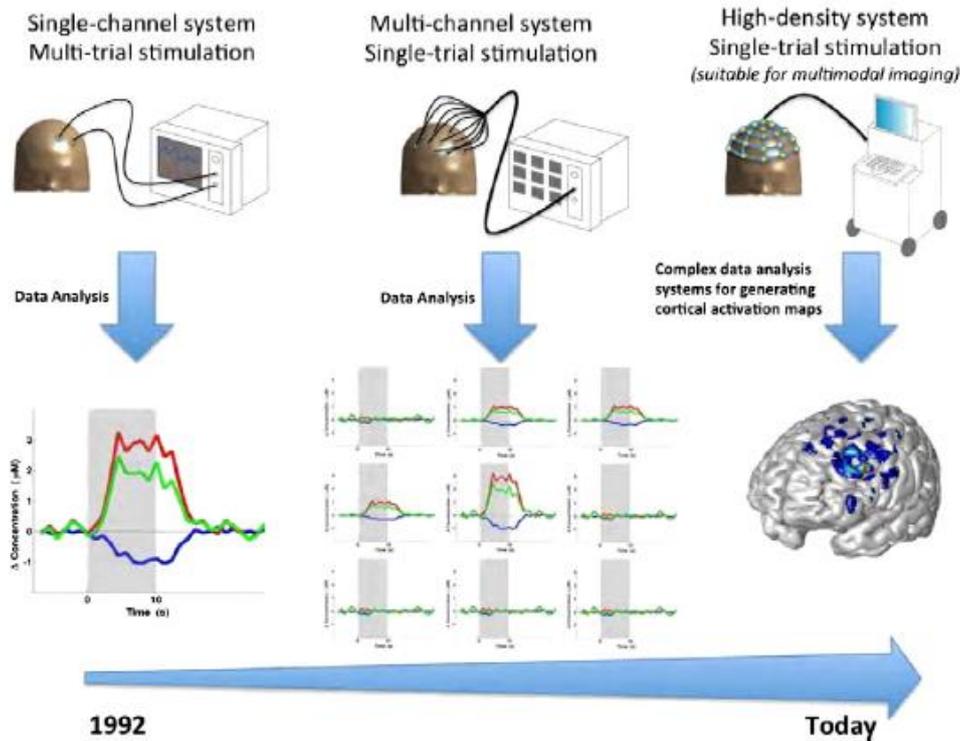


Figura 2.1 Evoluzione della strumentazione NIRS dal 1992 in configurazione single channel, ad oggi in configurazione multi-channel[11]

La rilevanza clinica del NIRS la dobbiamo a studi non sui singoli individui, ma su gruppi di pazienti, in quanto essendo variabili le caratteristiche fisiche tra un soggetto ed un altro, saranno variabili anche le risposte emodinamiche evocate. La difficoltà associata a questa tecnica è sia la standardizzazione del metodo di acquisizione dei segnali intra ed inter soggetto, sia l'analisi delle componenti del segnale comuni tra i soggetti, al fine di ricavare il maggior numero di informazioni riguardo la risposta cerebrale ad un determinato stimolo. Dal punto di vista tecnico, un passo avanti verso la standardizzazione dei processi di analisi potrebbe essere la selezione di lunghezze d'onda comuni a tutti i dispositivi, così come un miglioramento delle sonde utilizzate, che ridurrebbe l'incertezza dovuta alle diverse caratteristiche fisiche del soggetto. Inoltre, algoritmi di analisi dei segnali comuni tra i dispositivi, permetterebbero una comparabilità maggiore tra i dispositivi in commercio. L'utilizzo della legge di Lambert-Beer modificata (6), come anche l'impiego di emissioni di radiazione luminosa a bassa energia compresa tra i 5 mW e i 20 mW sono caratteristiche comuni ai dispositivi NIRS. Il numero di canali determinati dal numero di emettitori e ricevitori è parte fondamentale dello strumento, perché ne caratterizza il tipo di impiego. Possono arrivare fino a 512 canali teorici, ma effettivi ed utilizzabili, al massimo 200 dei limiti di dimensione della superficie da analizzare. Gli emettitori possono essere LED o diodi, mentre i fotorilevatori sono fotodiodi(PD) o fotodiodi

a cascata(APD). La risoluzione temporale (Hz) fornita dal produttore corrisponde al range di frequenze di campionamento alle quali lo strumento può funzionare. Maggiore è il numero di canali utilizzati, minore sarà la frequenza massima. Ogni dispositivo dispone di multiplexing (MUX) per distinguere i segnali a diverse lunghezze d'onda. Multiplexing nel tempo (t) nel quale i diodi irradiano in determinati slot temporali, nella frequenza (f) nel quale i diodi rimangono attivi e diodi diversi emettono modulando la frequenza e infine Multiplexing code (c) che permette l'attivazione di diodi tramite sequenze di bit. La distanza tra emettitore e ricevitore (SDS) viene indicata dal produttore, fornendo range nei quali si assicura il corretto utilizzo dello strumento. In alcuni casi sia sorgente che ricevitore sono uniti nella stessa sonda, rendendo la SDS fissa. Di elevata importanza è l'indossabilità del dispositivo. Il vantaggio del NIRS è che è un metodo di analisi non invasivo nel quale al soggetto, durante l'acquisizione, può essere richiesto di compiere task motori, quindi è importante la portabilità del dispositivo quanto la stabilità delle sonde sul soggetto. La marcatura CE non è obbligatoria per scopi di ricerca. In figura 2.2 vengono confrontate diverse soluzioni di dispositivi NIRS proposti sul mercato.

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

Figura 2.2 Confronto delle caratteristiche tecniche dei maggiori produttori di dispositivi NIRS.[5]

2.2 NIRO-200NX

Il dispositivo commerciale utilizzato come riferimento è il *NIRO-200NX* di Hamamatsu(figura 2.3). Il dispositivo in questione presenta un'acquisizione bi-canale in onda continua CW. Utilizza la MBLL (2) per ricavare le concentrazioni relative di O₂Hb, di HHb e della emoglobina totale intesa come somma delle concentrazioni dei due cromofori. È presente la modalità SRS per il calcolo dell'indice di saturazione di un tessuto (TOI) inteso come

rapporto tra la concentrazione di emoglobina ossigenata con quella totale. Utilizza emettitori LED alle lunghezze d'onda di 735 nm, 810 nm ed 850 nm dalla potenza inferiore di 2 mW ed un range di frequenze di campionamento da 2 a 20 Hz. Il ricevitore è un fotodiode. La dotazione comprende un'unità con display di peso 6kg, rendendolo poco portatile, sul quale vengono visualizzati i segnali ed è possibile il collegamento ad un pc come estensione dello schermo e stampaggio dati. Un'unità AMP, le sonde riutilizzabili e la batteria incorporata permette un'autonomia di circa 30 min che per i nostri fini non sono sufficienti, quindi sarà necessario alimentarlo esternamente.



Figura 2.3 Dispositivo NIRO-200NX di Hamamatsu. Unità display, unità AMP e sonde.[19]

2.3 Prototipo di dispositivo NIRS

Il dispositivo NIRS da validare è strutturato come in figura 2.4.

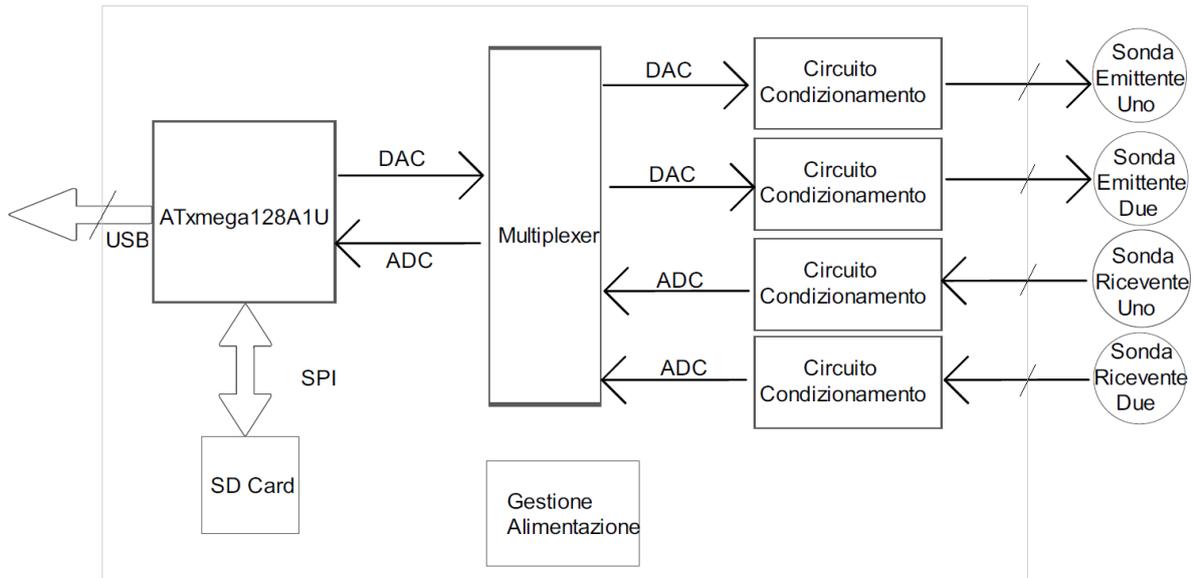


Figura 2.4 schema a blocchi prototipo dispositivo NIRS.

Il microcontrollore AtxMega128A1U utilizza il proprio convertitore digitale-analogico (DAC) per pilotare le due sonde emittenti utilizzando il proprio convertitore analogico-digitale (ADC) per campionare i segnali ricevuti dalle due sonde riceventi. Presenta una configurazione bi-canale (dual-channel). Per ciascuna sonda emittente sono utilizzati tre LED alla lunghezza d'onda di 740 nm, 830 nm ed 880 nm rispettando gli spettri di assorbimento dei cromofori. La seconda lunghezza d'onda appartiene all'analisi della citocromo ossidasi (CtOx). Le sonde riceventi sono composte da fotodiodi. L'ADC del controllore ha risoluzione di 12 bit con una dinamica da 0 mV a 2048 mV. Il microcontrollore comunica con un PC esterno tramite modulo USB e la possibilità di salvare i dati è presente tramite utilizzo di micro SD Card.

Il sistema proposto, utilizza la tecnica NIRS CW seguendo la legge di Lambert-Beer modificata (2), operando alla frequenza di 10 Hz nei quali i LED si attivano e disattivano in successione al fine di rilevare prima il segnale attenuato ed in seguito il rumore di fondo. È possibile modulare l'intensità luminosa dei LED. Produce 8 variabili da 16 bit ogni 100 ms che corrispondono a 160 B/s in configurazione dual-channel e a 80 B/s in configurazione single-channel. Possiede tre modalità di funzionamento:

1. Visualizzazione: I dati sono inviati in tempo ad un PC esterno collegato tramite modulo USB rendendo possibile la visualizzazione grafica dei dati.
2. Registrazione: I dati sono salvati su supporto micro SD Card.
3. Visualizzazione e registrazione: entrambe le modalità operano contemporaneamente.

Il dispositivo è dotato di interfaccia grafica tramite la quale è possibile inserire marker sui segnali per l'identificazione di eventi.

L'alimentazione avviene tramite batteria ricaricabile a ioni di Litio con tensione nominale di 3,7 V e capacità di 3450 mAh. La batteria è ricaricata tramite chip di ricarica, collegato alla VCC della porta USB, permettendo la ricarica tramite collegamento esterno USB. La tensione di alimentazione del dispositivo è di 2,8 V stabilizzata da due regolatori di tensione lineari (LDO). Uno step-up converter fornisce una tensione di 5,5 V utilizzata per il pilotaggio LED e un invertitore di tensione che fornisce -2,8 V utilizzata nel condizionamento del segnale in uscita dal fotodiode.

2.4 Elementi essenziali per la richiesta di valutazione delle indagini cliniche con dispositivi medici

Per poter validare un dispositivo medico (DM) è necessario disporre della documentazione completa riguardo il dispositivo medico ed il tipo di studio fatto. Dovrà quindi essere indicato il Fabbricante del dispositivo medico ed il mandatario, indicando il titolo e la versione del protocollo clinico effettuato per validare il dispositivo medico. Dovrà essere definita la destinazione d'uso al fine di ottenere il marchio CE. Il prototipo del dispositivo NIRS viene definito come dispositivo attivo non invasivo di Classe IIa secondo la *regola 10 dell'Allegato VII del regolamento (UE) 2017/745*. Tale regola definisce il prototipo un dispositivo attivo destinato ad un diretto monitoraggio dei processi fisiologici vitali le cui variazioni non implicano un pericolo immediato per il paziente. È necessario indicare inoltre, se vi sia la presenza di tessuto animale a rischio encefalopatie spongiformi trasmissibili (TSE).

Nel documento deve essere fatto riferimento alle pagine del fascicolo tecnico del dispositivo indicando una sintesi delle caratteristiche generali e di funzionamento, quali ad esempio:

- Descrizione dell'avanzamento del settore tecnologico;
- Descrizione tecnica ed illustrata del dispositivo medico;
- Descrizione dei componenti e dei materiali utilizzati per la costruzione;
- Materiali che vengono a contatto con il corpo umano e funzione del DM sul corpo umano;
- Descrizione tecnica del funzionamento del DM;
- Descrizione metodi di sterilizzazione e produzione del DM;

- Descrizione del confezionamento primario e secondario, con riferimenti ai processi di mantenimento della sterilità;

Di fondamentale importanza è dichiarare la presenza o meno di medicinale e, se presente, è necessario indicare se il funzionamento del DM sia imprescindibile da esso. Bisogna indicare i documenti del fascicolo tecnico inerenti l'analisi del rischio effettuata ed a quali norme siano state applicate, riportando il rapporto finale di tale analisi in cui viene discussa l'accettabilità dei rischi associati al dispositivo. Va indicato quale sia stato il processo di studio che abbia portato all'ideazione dell'indagine clinica e quali siano i risultati ottenuti per ogni prova effettuata. La sezione successiva riguarda le informazioni generali sul protocollo clinico. Bisogna fare riferimento ai centri partecipanti alla sperimentazione, chi sia il coordinatore della ricerca e quale sia il numero dei pazienti coinvolti nella sperimentazione (se effettuata *in vivo*). Di elevata importanza è il rationale dello studio, che deve rispondere alle domande "perché lo studio è stato svolto in un determinato modo? Quali risultati mi aspetto?". Quindi è necessario che siano indicati gli obiettivi dello studio, quali siano i criteri di inclusione ed i criteri per la valutazione dell'efficacia del DM o, come nel nostro caso, per valutare il prototipo in confronto ad un dispositivo attualmente in commercio. La valutazione delle prestazioni risulta quindi di primaria importanza, indicando inoltre se vi siano stati fatti o meno studi statistici dei dati ricavati. Nel caso in cui venga effettuata una valutazione statistica dei dati, facendo riferimento al confronto tra i due dispositivi, se non è possibile distinguere andamenti diversi, allora i due dispositivi saranno comparabili.

2.5 Metodi di Validazione

Una fase fondamentale per la validazione di uno strumento biomedicale consiste nella ricerca e/o realizzazione di un approccio/metodologia volto a ricavare risultati che saranno poi utilizzati per certificare il corretto funzionamento dello stesso. E' necessario quindi dimostrare uno stabile e sicuro funzionamento dello strumento prima di passare alla fase dell'indagine clinica. Essendo questo uno strumento di monitoraggio su soggetti umani, è necessario che sia affidabile, sicuro e fornisca misurazioni esatte al fine di una corretta interpretazione delle stesse.

I metodi di validazione utilizzati per i dispositivi NIRS non sono comuni a tutte le case produttrici, perché, ad oggi, non vi è ancora una standardizzazione del metodo di acquisizione ed analisi dei dati.

Le soluzioni proposte al momento per la validazione del dispositivo sono:

- la costruzione di un modello o fantoccio fisico che simuli le caratteristiche umane della zona da analizzare
- il confronto dello strumento con un device presente in commercio e quindi già validato.

Il metodo più utilizzato in letteratura è il secondo. Si cerca di dimostrare l'affidabilità del proprio prodotto confrontandolo con uno già consolidato sul mercato. Questo metodo, oltre ad essere efficace, risulta meno costoso della progettazione e costruzione di un fantoccio. In questo caso non vi è una fase di studio preliminare, progettazione e costruzione del fantoccio che potrebbe non fornire i risultati auspicati, ma ci si limita all'acquisizione di un dispositivo commerciale. Si guadagna quindi anche in termini di tempo impiegato nella validazione. Le indagini cliniche come quella di *Alansiz et al.*[20] sono numerose. Tramite l'utilizzo di uno sfigmomanometro posto sul braccio sinistro, si è dimostrato come i due device di monitoraggio, a confronto, siano in grado di rilevare i cambiamenti emodinamici nell'avambraccio dovuti all'occlusione arteriosa da sfigmomanometro come in figura 2.5.

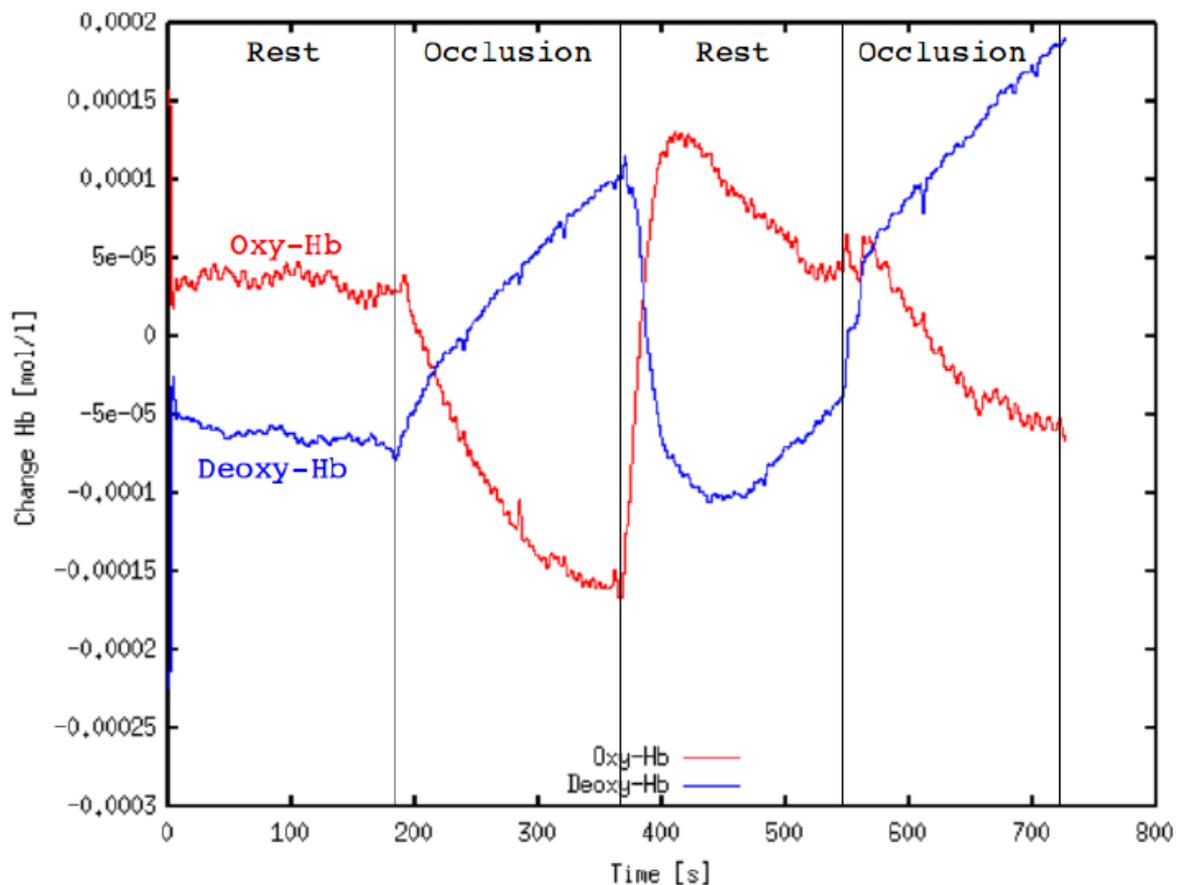


Figura 2.5 Concentrazioni relative di emoglobina ossigenata (in rosso) e emoglobina deossigenata (in blu) in periodo di riposo e durante occlusione arteriosa da sfigmomanometro.[20]

[20]Un ulteriore metodo di indagine clinica consiste nel misurare l'attività cerebrale emodinamica in soggetti con cardiopatie a riposo per una durata di 2 ore. Il confronto dei risultati, avviene poi per ricalibrazione dello strumento in test, nel caso in cui i risultati differiscano. Infatti sono da considerare errori dovuti ai diversi offset degli strumenti e alle diverse calibrazioni. L'analisi statistica viene poi effettuata tramite metodo Bland-Altman con misure ripetute per ogni dispositivo sullo stesso soggetto, valutando l'accordo tra i due metodi.[21]–[23] Il nostro lavoro ha comportato l'ideazione di un protocollo di acquisizione dei segnali da task di apnea espiratoria registrati sulla corteccia prefrontale tramite lo strumento NIRS NIRO-200NX su 3 soggetti. È stata effettuata in seguito un'analisi dati con lo scopo di classificarli.

Il primo metodo, come già anticipato, presenta un approccio e tempistiche di lavoro del tutto diverse. Creare un fantoccio richiede una fase preliminare di studio e progettazione sui materiali che andranno a comporlo. Richiede l'utilizzo di una strumentazione non sempre presente nei laboratori (es. spettrofotometro) per via dei diversi campi di studio, come ad esempio quello ottico e strutturale e chimico, che vanno a convergere per la sua creazione. Una volta progettata la struttura ed identificate le proprietà ottiche, è necessario ideare un sistema nel quale si possa far variare la concentrazione di emoglobina ossigenata e deossigenata in modo dinamico ed accurato. Inoltre, creare un fantoccio utilizzi sangue, richiede autorizzazioni specifiche per l'utilizzo in laboratorio, così come la strumentazione adatta.

Capitolo 3: Fantocci di calibrazione

3.1 Introduzione ai fantocci di calibrazione

All'interno dell'elaborato si è cercato di analizzare entrambi gli approcci. Non è stato possibile progettare e costruire il fantoccio, ma si è cercato di ricavare da letteratura quali possano essere delle soluzioni che evidenzino i problemi relativi la realizzazione e costruzione del fantoccio ed i metodi di misurazione ed analisi dei dati su di esso. Sono analizzate alcune soluzioni che includano il metodo ed i materiali necessari alla realizzazione del fantoccio. Viene infine effettuata un'analisi SWOT finalizzata alla realizzazione di questi tipi di fantocci in laboratorio.

Ci sono due tipologie di fantoccio utili per lo scopo. Fantocci liquidi e solidi. I fantocci solidi simulano le caratteristiche fisiche di un organo tramite una miscela di composti che utilizzano un elemento di scattering, uno assorbente della radiazione luminosa ed un silicone che una volta indurito darà la struttura alla miscela. Questi tipi di fantocci presentano notevoli pregi, quali la semplicità di realizzazione ed i costi contenuti, ma tramite questi non è possibile simulare i cambiamenti emodinamici che avvengono all'interno dei tessuti. Sarà necessario quindi realizzare tanti fantocci quante sono le misurazioni che si vogliono effettuare e variare ognuno di essi per caratteristiche ottiche, rifacendosi ai valori di assorbimento dell'emoglobina nei vari stati di ossigenazione.

I fantocci liquidi, invece, sono di più complessa realizzazione e mantenimento, ma permettono di osservare un cambiamento in tempo reale delle caratteristiche ottiche di assorbimento e scattering del fantoccio conferendo maggiore fedeltà nel riprodurre le condizioni in vivo.[24][25] [26][27]Il problema principale dell'utilizzo dei fantocci risiede nei metodi di misurazione[28]. E' necessario sapere a priori quale sia il valore da validare per poter poi effettuare una misurazione accurata sul fantoccio ed avere conferma del risultato. Nei fantocci solidi, però, le caratteristiche del materiale possono cambiare nel tempo.

Tramite il secondo approccio di studio, invece, si è ideato un protocollo di acquisizione dei segnali che fornisce una bassa variabilità di segnale intra ed inter soggetto. Sono stati poi analizzati e classificati i dati per dimostrare la similarità degli output dei diversi strumenti.

3.2 Fantocci solidi

I fantocci solidi sono creati con lo scopo di studiare i meccanismi di propagazione delle onde luminose attraverso i tre strati extracerebrali i quali in ordine dall'esterno all'interno sono: scalpo, cranio, liquido cerebrospinale.

La conoscenza dei coefficienti di assorbimento (μ_a) e di scattering ridotto (μ_s') sono requisiti fondamentali per la riuscita di un fantoccio solido verosimile. Questi coefficienti dipendono dalla lunghezza d'onda alla quale sono calcolati, motivo ulteriore per il quale la maggior parte delle volte i fantocci sono creati basandosi sulle lunghezze d'onda utilizzate dai dispositivi NIRS da analizzare e/o validare, quindi ottenere dei coefficienti quanto più accurati è il primo passo da fare per la realizzazione di un fantoccio.

I coefficienti μ_a e μ_s' possono essere calcolati tramite la teoria di Mie [29], simulazioni che utilizzino il metodo Monte Carlo [30] oppure utilizzando uno spettrofotometro. Questo strumento è in grado di analizzare la quantizzazione di una sostanza in base al suo spettro di assorbimento della luce, quindi è possibile modificare la composizione chimica del fantoccio per renderla il più simile possibile a quella della situazione reale.

La scelta dei materiali è il fattore chiave per la riuscita di un fantoccio utile allo scopo. In letteratura i materiali più utilizzati come struttura del fantoccio sono l'agar, resine in epossidica, ed altri materiali polimerici trasparenti che possano essere liquefatti e poi induriti in uno stampo. Gli agenti di assorbimento maggiormente utilizzati sono coloranti come il nero carbone o l'Inda[31], mentre quelli che conferiscono la proprietà di scattering della luce sono il Biossido di Titanio (TiO_2) e l'ossido di alluminio (Al_2O_3). Sarà necessario quindi realizzare un numero di fantocci adeguato in base a quanti e quali tipi di studi si vorranno fare, perché la caratteristica di questo tipo di fantoccio è la stabilità nel tempo, quindi sono ideali per misure statiche, di prototipazione e di scelta delle migliori lunghezze d'onda del dispositivo da analizzare.

3.2.1 Fantoccio multilayer Izzetoglu et al.

Il fantoccio solido proposto da *Izzetoglu et al.*[32] ha cercato di unire le due tipologie di fantoccio, ma per un tipo di studi diverso dal nostro in esame, quindi verrà analizzata solo la parte solida di esso. Si tratta di un fantoccio multilayer che vuole mimare i tre strati extracerebrali. Questo tipo di fantoccio, riempito con un fantoccio liquido studiato ad hoc e unito ad un sistema di ossigenazione e deossigenazione adeguato, potrebbe rivelarsi come una

evoluzione del sistema ideato da Hamamatsu [33] nel 1999 per la validazione del dispositivo NIRS NIRO-300.

La forma utilizzata è quella cubica priva della facciata superiore per permettere l'inserimento all'interno di un fantoccio liquido che rappresenti i cambiamenti dinamici del cervello. Ogni lato del cubo ha delle caratteristiche diverse per simulare differenti condizioni di misura. Le facciate laterali verranno nominate A, B, C, D. Alle facciate A e B corrispondono i 3 strati extracerebrali. La facciata C simula il liquido cerebrospinale e D solo scalpo e cranio. Sono posti filtri a densità neutra sopra lo strato con scalpo per simulare il colore di pelle scuro. In figura 3.1 viene mostrata la struttura del contenitore.

Materiali:

- RTV 12 silicone product (GE Silicones) :

RTV 12A (base) RTV 12C (agente indurente). Ratio 20:1. Tempo di indurimento 72h.

- Carbon Black (Raven 5000 Ultra II) in particelle di dimensioni di 8nm (agente assorbente).
- TiO₂ da Sigma(T-8141) (componente di scattering).

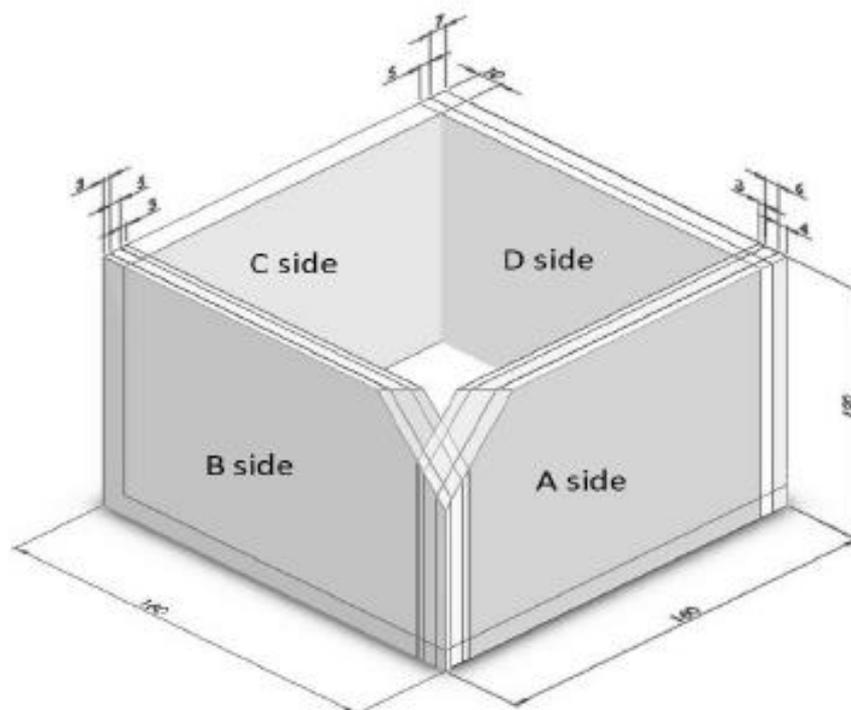


Figura 3.1 Schema fantoccio solido con misure espresse in mm.[32]

Processo di Fabbricazione:

Viene utilizzata la tecnica del cast molding per ottenere ciascun layer. Questo processo consiste nel preparare una miscela in ratio differenti di carbon black e TiO₂ con RTV12 cercando di emulare μ_a e μ_s' dei tessuti extracerebrali ad una determinata lunghezza d'onda. Successivamente avviene la verifica delle proprietà ottenute tramite un sistema di misura basato su di una tecnica nel dominio della frequenza : “*in-phase and quadrature (IQ) system*”. Viene versata poi la soluzione nello stampo per ottenere lo spessore richiesto. E' necessario attendere 24 ore per la solidificazione del primo strato. Avviene poi la ripetizione del processo per gli altri strati fino ad arrivare alla facciata designata per lo scopo. Per lo strato C che rappresenta il liquido cerebrospinale è stato utilizzato solo RTV 12 con $\mu_a=0.0365 \text{ cm}^{-1}$ e $\mu_s' = 1.02 \text{ cm}^{-1}$ poco dissimile da quello dell'acqua utile a dare priorità all'analisi del contenuto del fantoccio. In tabella 3.1 sono indicati i valori dei coefficienti di assorbimento e scattering ridotto degli strati realizzati.

Tabella 3.1 Proprietà ottiche del fantoccio solido e delle facciate misurate alla lunghezza d'onda di 810nm. [32]

Sides	Scalp		Skull	
	$\mu_a \text{ (cm}^{-1}\text{)}$	$\mu_s' \text{ (cm}^{-1}\text{)}$	$\mu_a \text{ (cm}^{-1}\text{)}$	$\mu_s' \text{ (cm}^{-1}\text{)}$
A	0.1043	12.49	0.0891	12.12
B	0.0873	10.86	0.081	12.98
C	-	-	-	-
D	0.0934	11.89	0.0716	12.62

3.2.2 Fantoccio Zhang et al.

Un ulteriore traguardo nel campo dei fantocci solidi per NIRS è stato raggiunto da Zhang et al.[34] i quali hanno realizzato una serie di fantocci solidi rappresentanti i cinque strati della testa umana, costruendo una struttura anch'essa multilayer costituita in ordine da: sclapo (scalp), teschio (skull), liquido cerebrospinale, materia grigia e materia bianca. La materia grigia è lo strato fondamentale in cui si riflettono gli stati di ossigenazione dei vasi e quindi è lo strato in cui si riflette l'attività cerebrale.

Sono stati ricavati quindi tanti fantocci multilayer quanti sono gli stati ossigenati della materia grigia da analizzare. Questo tipo di fantoccio permette di effettuare misurazioni che

devono corrispondere ai valori di concentrazione di cromoforo che si era prefissato di ottenere durante la realizzazione del fantoccio e l'assemblaggio dei vari ingredienti.

Materiali e Strumentazione:

- Soluzione intralipidica 20% (agente di scattering).
- Inda ink (componente assorbente).
- Agar (stabilizzatore elettronico).
- Acqua distillata.
- Stampo in vetro 80x60mm con differenti spessori.
- Spettrofotometro.
- Camera incubatrice.



Figura 3.2 Materiali utilizzati e fantocci con diverse proprietà ottiche in base alla concentrazione di materiali utilizzati.[34]

Processo di fabbricazione: Le proprietà ottiche del cervello sono ottenute mischiando la soluzione intralipidica, l'inchiostro inda e l'acqua distillata in proporzioni differenti. Lo spettrofotometro è utilizzato per misurare il coefficiente di assorbimento della soluzione

ottenuta e per valutare l'aggiunta di altro inchiostro inda. Aggiungendo una quantità equivalente di acqua distillata alla soluzione intralipidica 20% si ottenere una soluzione intralipidica 10% che permette un calcolo migliore del coefficiente di scattering. L'1% di agar viene disciolto in acqua distillata. Un fornello a 85°C aiuta l'agar a disciogliersi. A 60°C vengono aggiunti inchiostro e soluzione intralipidica 10% in base al tessuto che si vuole ottenere. La soluzione viene versata nello stampo e posta in camera incubatrice, finchè non si sia solidificato il prodotto. Per simulare la dinamicità dell'attività cerebrale, il coefficiente di assorbimento della materia grigia varia del 5% rispetto quello base in tabella 3.2 di $\mu_a = 0,038\text{mm}$.

Tabella 3.2 Coefficienti di assorbimento e scattering ridotto della testa umana.[34]

No.	Scalp (3 mm) (mm^{-1})	Skull (7 mm) (mm^{-1})	CSF (2 mm) (mm^{-1})	Gray matter (4mm) (mm^{-1})	White matter (4 mm) (mm^{-1})
1	$\mu_a = 0.022$ $\mu_s = 2.11$	$\mu_a = 0.016$ $\mu_s = 1.79$	$\mu_a = 0.0045$ $\mu_s = 0.27$	$\mu_a = 0.038$ $\mu_s = 2.39$	$\mu_a = 0.016$ $\mu_s = 9.62$

Grazie alla definizione di assorbanza e alla relazione tra densità ottica e la capacità di assorbimento descritta da Zhang et al. è possibile ricavare i coefficienti di scattering e di assorbimento degli strati di materia grigia che sono mostrati in figura 3.3. Si nota come i coefficienti di assorbimento e l'assorbanza, nonché definita come densità ottica, siano in relazione lineare. Nello scatter plot vi sono rappresentati i valori misurati (MV) alle lunghezze d'onda utilizzate e la linea di regressione lineare (LR). Sono quindi mostrati i cambiamenti di densità ottica dovuti dai cambiamenti dei coefficienti di assorbimento. Questo dimostra come la legge di Lambert-Beer modificata (2) sia rispettata.

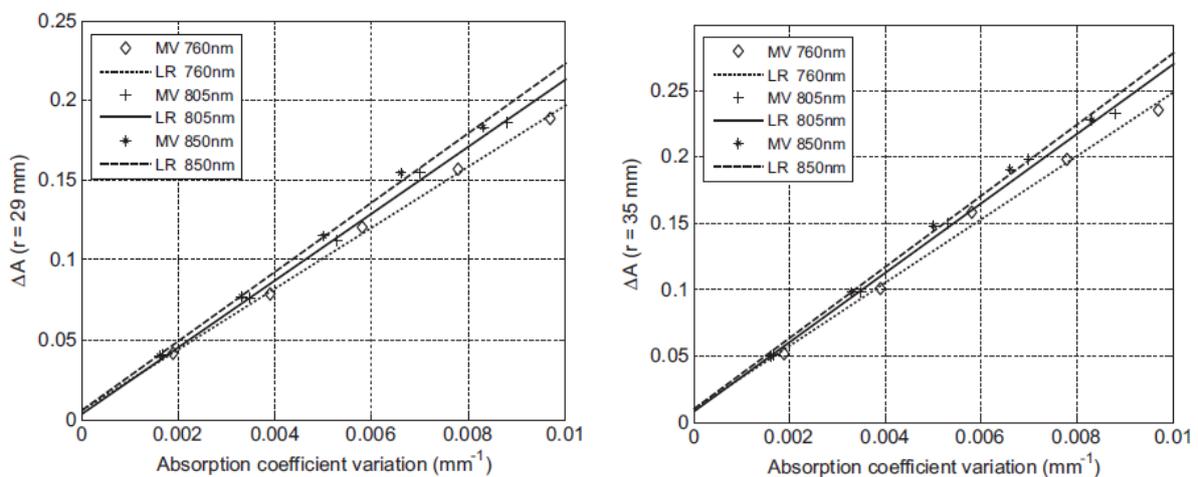


Figura 3.3 in ordinata l'assorbanza o densità ottica; in ascissa i coefficienti di assorbimento dei layer di materia grigia. A sinistra vi è una distanza tra sonde di 29mm; a destra di 35mm.

3.3 Fantocci liquidi

Essendo l'obiettivo di un dispositivo NIRS indagare sui cambiamenti dinamici dei valori di concentrazione dell'emoglobina (ossigenata o ridotta), allora i fantocci liquidi, che rappresentano una simulazione della realtà, insieme ad algoritmi di analisi sviluppati sugli stessi sono la soluzione da utilizzare.

Ci sono due tipi di approcci di progettazione di fantoccio liquido in base al metodo di misurazione utilizzato. Può essere continuo in cui si copre un certo range di StO_2 (saturazione di ossigeno tissutale) definito come la concentrazione di emoglobina ossigenata rispetto a quella totale, oppure possono essere effettuati incrementi successivi dello stesso.

3.3.1 Fantoccio Suzuki et al.

Il primo esempio di fantoccio liquido analizzato risale al 1999 ed appartiene ad Hamamatsu Photonics. Il dispositivo NIRS NIRO-300 (Hamamatsu Photonics) consente il monitoraggio dei cambiamenti di concentrazione della citocromo-ossidasi e dell'indice di ossigenazione del tessuto chiamato TOI e corrisponde al rapporto tra concentrazione di emoglobina ossigenata (O_2Hb) e l'emoglobina totale ($c_{tHb} = O_2Hb + HHb$). Questa misura sarà comparata con delle acquisizioni effettuate da un blood Gas Analyzer (Nova Biomedical) in emogasanalisi la quale ricava il valore di SO_2 (saturazione di ossigeno) tramite analisi delle pressioni parziali dei gas arteriosi e del pH del sangue, corrispondenti infine al livello di ossigenazione del tessuto, paragonabile al TOI.

Lo strumento utilizza la SRS (*spatially resolved spectroscopy*) dove il coefficiente di assorbimento viene ricavato dal decremento nella luce riflessa come funzione della distanza dalla sorgente luminosa.

I fantocci utilizzati da Hamamatsu Photonics utilizzano, in diverse concentrazioni, una soluzione dei seguenti Materiali:

- sangue umano contenente un concentrato di eritrociti con emoglobina
- Intralipid
- acqua (0.96% Dulbecco PBS).

Il PBS serve a stabilizzare la soluzione, perché ha osmolarità e concentrazione di ioni simili a quelli del corpo umano. Intralipid è l'elemento che induce lo scattering dell'onda luminosa. Sono stati realizzati fino a sei fantocci con percentuali di ingredienti diverse. Il fantoccio ha forma di contenitore di grandezza 170x170x140mm ed è di colore scuro per attenuare la luce ambientale e diminuire le interferenze esterne. Viene posto a temperatura controllata di 37°C. Sulla base di esso vi è uno stirrer che agita la soluzione. Sulla parete del contenitore sono poste le sonde del NIRO-300 e del BGA che misureranno rispettivamente la TOI e l'SO₂.

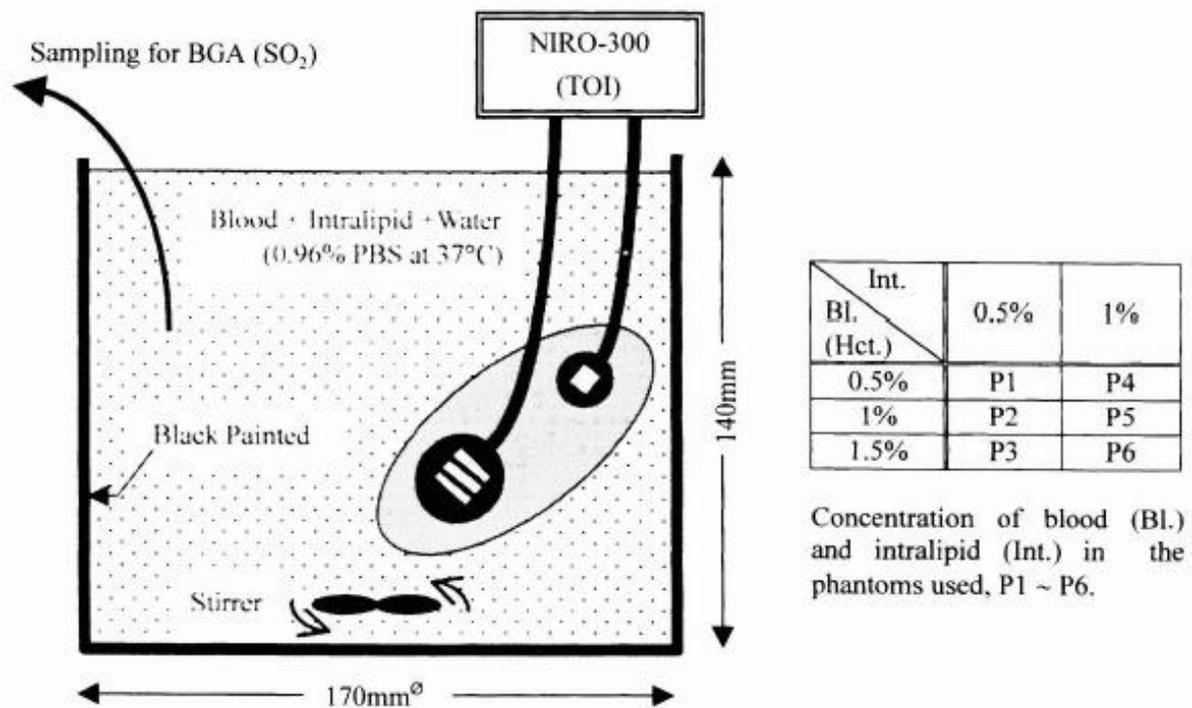


Figura 3.4 Struttura del Fantoccio a sinistra. Differenti concentrazioni dei fantocci a destra.[33]

Il metodo utilizzato da Hamamatsu Photonics per ottenere un cambiamento di concentrazione risiede nell'utilizzo di lievito e di un ossigenatore.

In partenza, la percentuale di ossigenazione nel fantoccio è pari al 100% e tramite l'aggiunta di lievito viene fatta calare sotto una certa soglia per via del consumo di ossigeno. A seguito di questo avviene l'ossigenazione con introduzione di O₂ che ristabilizza la soluzione alle condizioni iniziali di massima saturazione di ossigeno.

I risultati in figura 3.5 viene mostrato come sia presente un'elevata correlazione tra TOI ed SO₂ in tutti i fantocci utilizzati dimostrando come il NIRO-300 fornisca una misura accurata della concentrazione di emoglobina ossigenata nel tessuto.

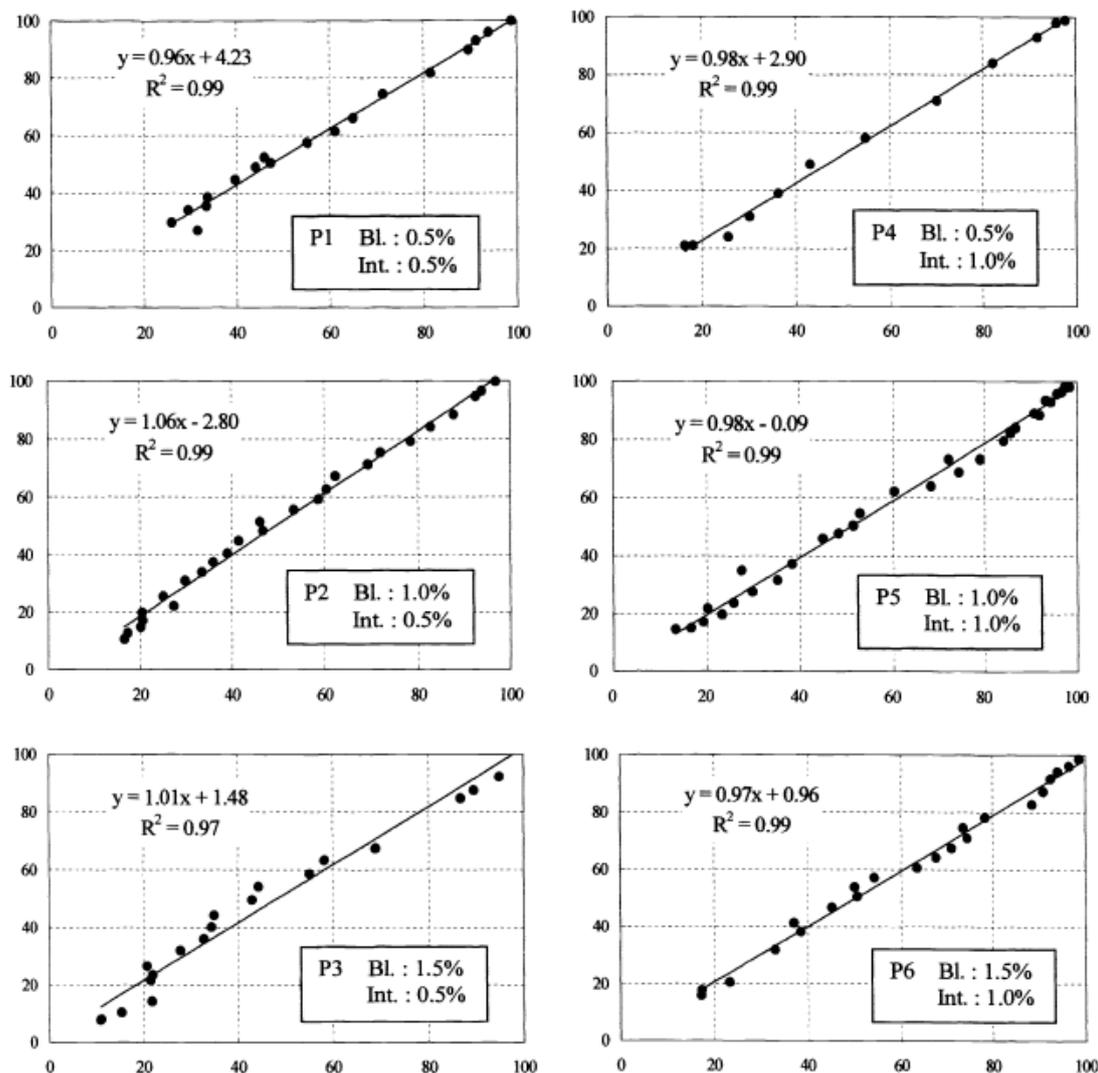


Figura 3.5 Correlazione tra TOI (NIRO-300) e SO₂ (BGA) nelle misure sui fantocci. Sulle ascisse è rappresentata la SO₂ (%), sulle ordinate la TOI (%). In ogni grafico è calcolata la regression line ed il coefficiente di correlazione.[33]

La maggiore problematica del metodo descritto da Suzuki et al. risiede nel fatto che non indichino il modo in cui abbiano lavorato con il BGA, infatti le procedure di analisi della saturazione di ossigeno nel sangue non sono elencate.

3.3.2 Fantoccio Isler et al.

Un ulteriore fantoccio simile a quello analizzato in precedenza viene proposto da Isler et al.[35] i quali hanno ideato un efficace metodo di ossigenazione e deossigenazione del sangue umano nel fantoccio. Vengono analizzati inoltre due tipi di deossigenazione per capire quale fornisca i risultati più attendibili. Deossigenazione tramite lievito e tramite N₂. In questo studio sono paragonati i risultati ottenuti da diversi dispositivi NIRS come il NIRO-200, INVOS 5100C e FORE-SIGHT Elite confrontati con OxiplexTS utilizzato come riferimento.

Il fantoccio proposto da Isler et al. presenta ingredienti mostrati in tabella 3.3 con il rispettivo peso.

Tabella 3.3 Lista materiali per la realizzazione del fantoccio liquido.[35]

PBS (mL)	Blood (mL)	IL (mL)	SBB (mL)	Glucose (mL)	Yeast (g)	Htc (%)	c_{Hb} (μ M)
2500	34	74	20	3	3	0.87	47

Materiali:

- Phosphate buffered saline (PBS)
- Intralipid
- Sangue umano
- Sodium bicarbonate buffer (SBB) che è uno stabilizzatore di pH a 7.4

Il glucosio ed il lievito permettono la deossigenazione della soluzione tramite il consumo del primo da parte del secondo che risulta in una diminuzione di O_2 all'interno della soluzione. Il secondo metodo di deossigenazione analizzato è l'introduzione di N_2 all'interno della soluzione.

La struttura in figura 3.6 è costituita da un container con pareti scure e finestre trasparenti alle quali sono collegate le sonde degli ossimetri. Le pareti del container presentano le proprietà ottiche del cervello di un neonato. Sulla base, esternamente alla struttura, vi è un forno che mantiene una temperatura di $37^\circ C$ ed all'interno, sempre sulla base, uno stirrer che assicura omogeneità al liquido.

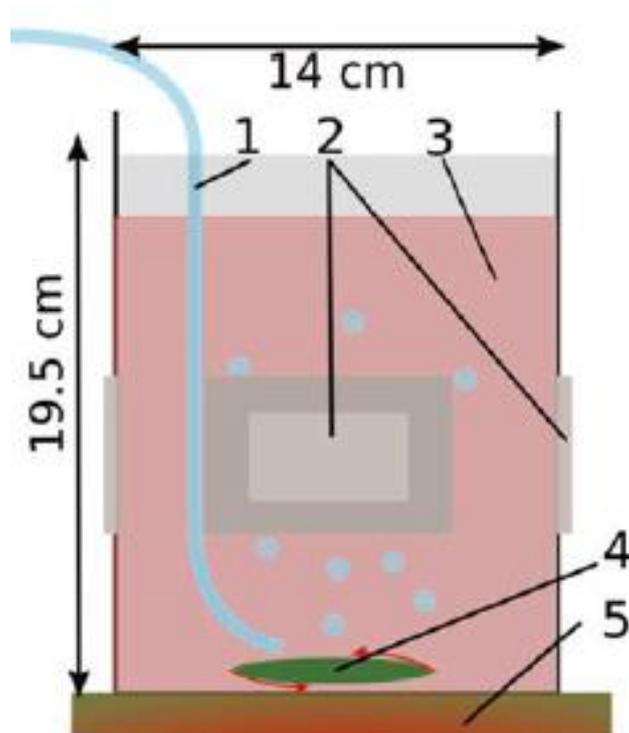


Figura 3.6 Setup del fantoccio liquido con utilizzo del tubo per l'ossigenazione di O₂ o N₂. [25]

Tramite questo tipo di fantoccio è stato possibile paragonare anche due tipi di deossigenazione confrontando come questi inducano una variazione del coefficiente di scattering (μ_s') della soluzione nel tempo. Questo coefficiente e le sue variazioni vengono misurate tramite dispositivo NIRS che lavora nel dominio della frequenza (OxiplexTS). Le misurazioni della StO₂ durante le fasi di deossigenazione tramite il dispositivo OxiplexTS comparato con quello dei dispositivi NIRO-200, INVOS 5100C e FORE-SIGHT Elite non hanno mostrato differenze significative.

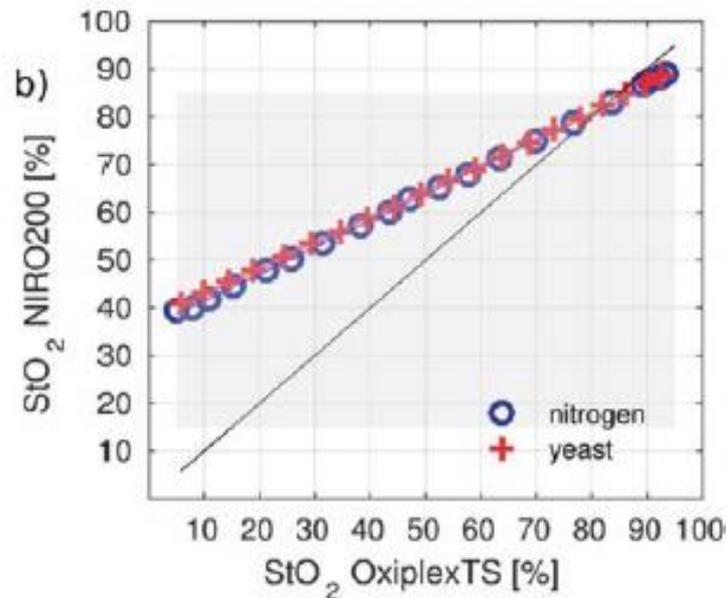


Figura 3.7 StO₂ calcolata dal NIRO200 confrontata con il riferimento OxiplexTS durante le due fasi di deossigenazione[35]

Come si evince dalla figura 3.7, le differenze di misura tra gli strumenti durante i due tipi di deossigenazione sono minime indicando come il tipo di deossigenazione non implichi alcun cambiamento nelle misurazioni. Risultati simili sono ottenuti tramite il confronto con gli altri strumenti NIRS.

I due metodi di deossigenazione, invece, hanno portato ad ottenere una diminuzione del coefficiente (μ_s') di scattering del 8,4% nel caso del ciclo con l' N_2 , mentre vi è una diminuzione del 2,3% nel caso del lievito pensando sia dovuto al maggiore tempo impiegato dal N_2 per deossigenare la soluzione oppure alla continua introduzione di N_2 che avrebbe generato un'aggregazione di lipidi facendo diminuire quindi μ_s' . Questa diminuzione del coefficiente di scattering genera un maggiore rumore nel ricavare il valore di StO₂ a basse concentrazioni favorendo, quindi, l'utilizzo del lievito come mostrato in figura 3.8. Infine il lievito è un

prodotto poco costoso che non genererà discrepanze all'interno delle proprietà ottiche della soluzione stessa.

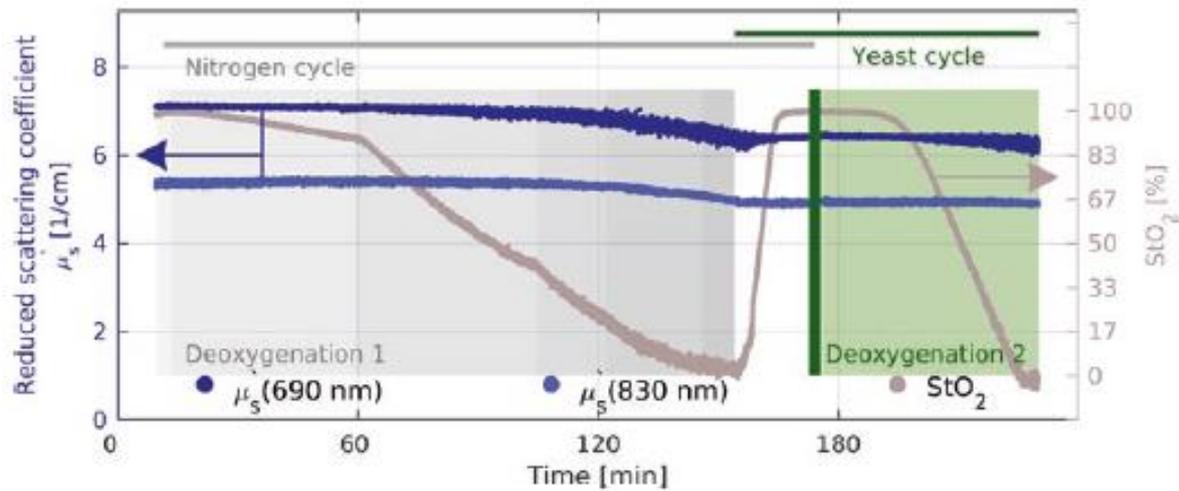


Figura 3.8 In rosa la StO_2 durante i due cicli di deossigenazione. In Blu il coefficiente di scattering dell'emoglobina ossigenata.[35]

3.3.3 Fantoccio Sorensen et al.

Ci sono numerosi studi sul NIRS e sui dispositivi ad esso associati da parte di Hyttel-Sorensen et al.[24] i quali nel 2013 si sono preposti di validare il proprio dispositivo NIRS chiamato OxyPrem tramite confronto con due dispositivi commerciali quali: INVOS 5100c (Medtronic) ed il NIRO-300 (Hamamatsu photonics). Le misurazioni effettuate dai dispositivi saranno poi comparate con il co-ossimetro indicante il livello di saturazione di ossigeno erogato e quindi presente all'interno del fantoccio stesso.

Materiali e strumentazione:

- Intralipid 200 mg/ml.
- Sangue umano.
- Citrato fosfato destrosio (CPD) anticoagulante.
- SAG-M.



Figura 3.9 Vista dall'alto del fantoccio liquido all'interno del contenitore e delle sonde utilizzate per le misurazioni.[24]

Il fantoccio è costituito da una miscela isotonica salina, una sospensione di eritrociti e da Intralipid 200 mg/ml. La sospensione di eritrociti è composta da CPD che è un anticoagulante e da sangue umano centrifugati. Questa viene sospesa in una soluzione salina, adenina, glucosio, mannitolo (SAG-M) ed un ematocrito al 64%. La miscela è allo 0,5% Intralipid con un ematocrito ad 1,5%. (figura 3.9)

Questo fantoccio è contenuto all'interno di un contenitore da 5 litri con diametro di 17,5 cm. Le sonde dei dispositivi da analizzare sono disposte lungo le pareti del contenitore. Il coefficiente di scattering ridotto di 0,5% Intralipid è $0,5 \text{ mm}^{-1}$ [36], [37] per emulare le caratteristiche della testa umana nell'infante.

Questo tipo di soluzione viene pompata tramite una membrana ossigenatrice (STÖKERT SIII) con un riscaldatore che mantiene il sistema a $37,5 \text{ }^\circ\text{C}$ e ad un pH di 7,4 tramite il bicarbonato di sodio. Il fluido viene mescolato tramite uno stirrer (KEBO-LAB MR 2000). Il gas erogato all'interno del sistema è una miscela di ossigeno, azoto e CO_2 .

L'intera struttura viene schematizzata in figura 3.10.

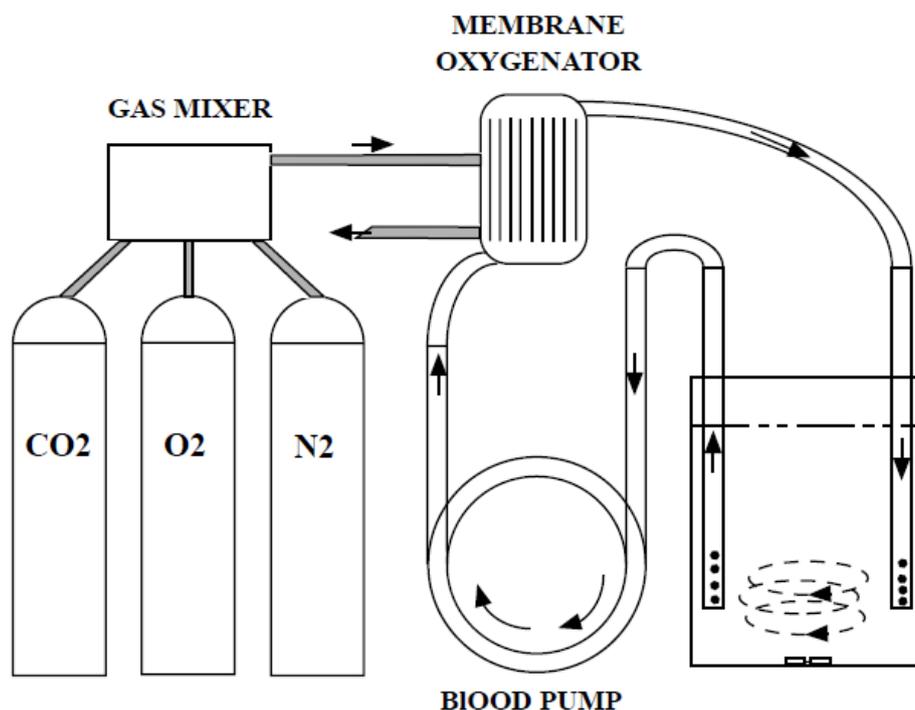


Figura 3.10 Rappresentazione schematica del fantoccio, della pompa del sangue, del miscelatore di gas e della membrana ossigenatrice.[24]

I risultati ottenuti dalle misurazioni sono poi confrontati con l' SO_2 ricavato da una misurazione effettuata direttamente sull'ossigenatore tramite il co-ossimetro ABL-800®.

All'inizio dell'esperimento vi sarà nel fantoccio la condizione di saturazione di ossigeno pari al 100% per poi essere abbassata tramite l'introduzione di azoto ed il consumo dell'ossigeno da parte del sangue. In ultimo verrà ristabilita la condizione iniziale.

Tramite l'equazione di Hill e la curva di dissociazione dell'emoglobina è possibile ricollegare la pressione parziale di O_2 (pO_2) con la SO_2 e riuscire a validare gli strumenti tramite questa metodologia.

Di seguito in figura 3.11 viene mostrato come i diversi dispositivi abbiano reagito all'esperimento paragonati ai valori di ossigenazione del fantoccio ricavati dalla misurazione diretta sull'ossigenatore.

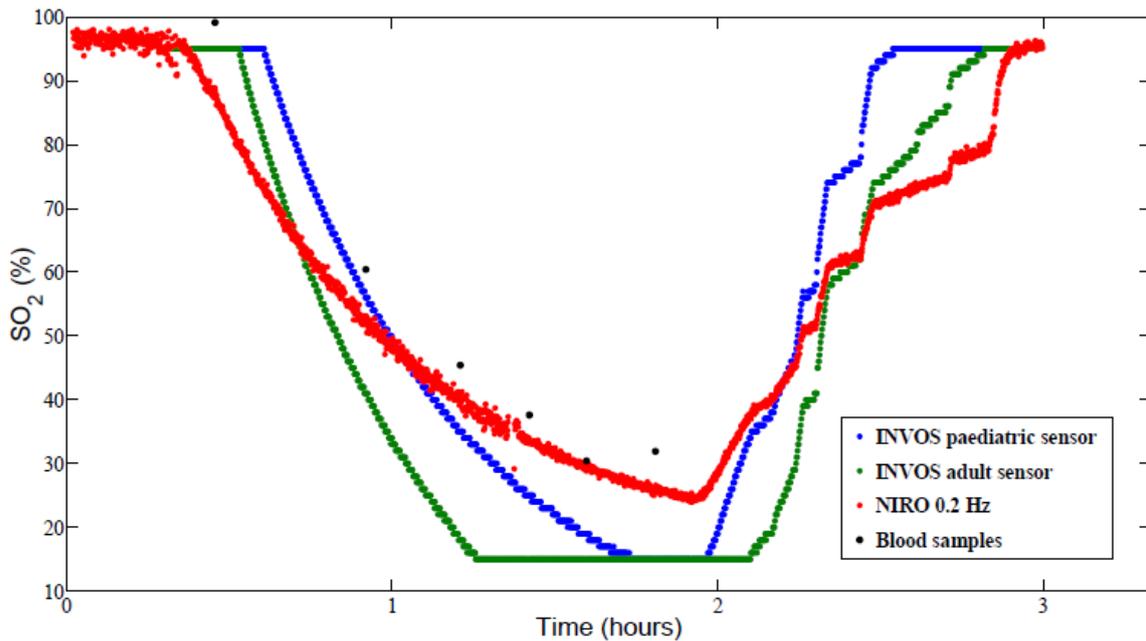


Figura 3.11 segnali NIRS ricavati dai dispositivi in esame paragonati con l'ossigenatore. In ascissa il tempo come durata dell'esperimento e in ordinata l' SO₂ (%)[24]

Tutti i dispositivi mostrano differenti valori di SO₂ con l'INVOS che presenta discrepanze evidenti intorno al 15% ed al 95% di saturazione di ossigeno. Tra l'INVOS 5100as ed il NIRO 300 è possibile notare un offset del 30% ed una pendenza del 53%. Il punto di intersezione delle due curve corrisponde al 65% di SO₂. Questa differenza dipende dall'algoritmo utilizzato dai due dispositivi in quanto il secondo calcola l'attenuazione della luce avvenuta tra i due sensori, mentre il primo oltre a calcolare la differenza di attenuazione della luce, la scala in maniera proporzionale allo spessore previsto dall'attenuazione subita ed in base alla distanza tra le sonde. Questa differenza però potrebbe essere dovuta anche a differenti calibrazioni dei dispositivi in base a look-up table proprietarie. Da tenere in considerazione inoltre vi è la geometria del fantoccio su cui sono stati creati questi algoritmi o look-up table e che estendere questo tipo di misurazioni al contesto in vivo non è al momento possibile per via della impossibilità di utilizzo dell'emogasanalisi come riferimento.

Infine la calibrazione del prototipo di laboratorio Oxyprem è stata possibile semplicemente tramite linear scaling che ha permesso di ottenere una buona fit (R^2 0,97; $p < 0,0001$).

3.3.4 Fantoccio Kleiser et al.

Un ulteriore problema da risolvere, per quanto riguarda una linea guida comune che possa uniformare i vari dispositivi, va ricercato nella difficoltà di rilevare in vivo la saturazione di

ossigeno tramite co-ossimetria. Volendo effettuare misurazioni in vivo valutando i cambiamenti di concentrazione dell'emoglobina ossigenata nella corteccia prefrontale, dovremmo ricavare dei campioni di sangue dalla vena giugulare, perché si assume che il 70% del valore che andremo a misurare, risiede in quel campione di sangue. Naturalmente questa percentuale di concentrazione non è costante e la difficoltà nel ricavare questo valore, ne rallenta di molto la ricerca .[38]

Il bulbo giugulare infatti rappresenta la quantità totale del flusso sanguigno che ritorna dal cervello e quindi non è rappresentativo della singola area analizzata tramite NIRS.

Tramite la costruzione del fantoccio analizzato più avanti verranno paragonati diversi ossimetri NIRS tra cui: OxiplexTS (ISS), il SenSmart X-100 in versione adulti e infanti (Nonin Medical), INVOS 5100c (Medtronic) e l' OxyPrem v1.3 che è il dispositivo prodotto in laboratorio da Kleiser et al. Vi sono due varianti disponibili della ISS: OxiplexTS che utilizza la tecnica FD che verrà utilizzata come punto di riferimento per la capacità di ricavare valori assoluti di concentrazione e l'OxyVLS in CW.

Anche in questo caso è presente un'ossimetria basata sul calcolo della StO_2 derivata da pressione parziale dell'ossigeno (pO_2) tramite equazione di Hill. La temperatura ed il pH sono rimasti costanti, ponendo il fantoccio su una superficie riscaldata aggiungendo del bicarbonato di sodio (SBB). Il valore di pO_2 è stato fatto variare da 0 fino a oltre i 10 kPa per ricoprire il full range di StO_2 . Diversi sensori sono stati utilizzati per rilevare in tempo reale i valori di pO_2 , pCO_2 , pH e temperatura.

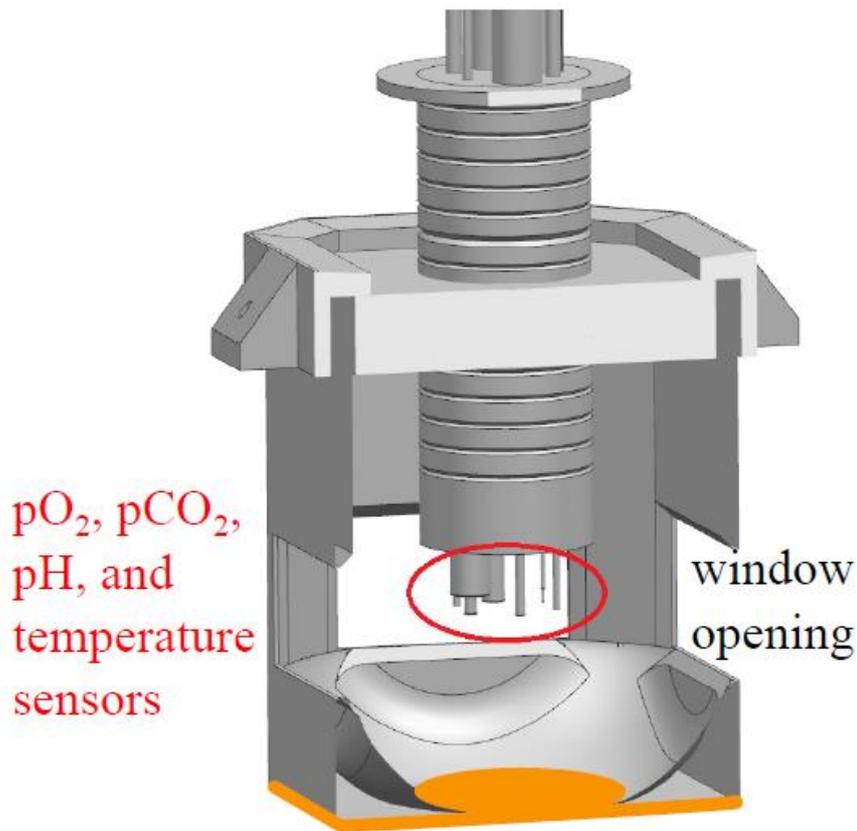


Figura 3.12 Container del fantoccio (vista di fronte taglio verticale) con sensore di pO_2 , pCO_2 , pH e temperatura all'interno del fantoccio stesso. Sulle finestre sono posti i sensori degli ossimetri NIRS. Il coperchio permette l'entrata di ossigeno e luce all'interno. La base in rame è indicata in arancione.[39]

In Figura 3.12 è presente il container costruito di materiale assorbente. Il coperchio lo isola dall'ambiente esterno. Uno stirrer assicura omogeneità al fantoccio e le finestre simulano le proprietà ottiche della testa del neonato. Un tubo immerso a 2 cm dal fondo fornisce ossigeno quando necessario. Sono costruiti due fantocci i quali subiranno processi di ossigenazione e deossigenazione diversi.

Materiali:

- Phosphate buffered saline (PBS)
- Sangue umano con ematocrito al 67%
- Intralipid 20%
- Sodium bicarbonate buffer 8,4% (SBB)
- Glucosio 50%
- Lievito

Entrambi i fantocci sono costituiti al 98% da acqua cercando di emulare le caratteristiche ottiche della testa dei neonati.[40] Però la variabilità di concentrazione di emoglobina totale (c_{tHb}) è differente tra un neonato ed un altro, quindi per ogni fantoccio sono poi ottenute misture con concentrazioni differenti: 25, 45 e 70 μM . La tabella 3.4 indica le quantità di materiali utilizzate per i fantocci.

Tabella 1.4 Lista materiali per la realizzazione dei tre fantocci liquidi. Da 25, 45 e 75 μM . Yeast 1 e yeast 2 indica la quantità di lievito utilizzato nei fantocci rispettivamente 1 e 2.[39]

mixture	PBS (mL)	blood (mL)	IL (mL)	SBB (mL)	glucose (mL)	yeast 1 (g)	yeast 2 (g)	htc (%)	c_{tHb} (μM)
no.1	2500	20	74	15	3	1.5	3	0.52	26.32 \approx 25
no.2	2500	33.5	74	25	6	1.5	3	0.86	43.85 \approx 45
no.3	2500	53.5	74	35	9	3	3	1.36	69.5 \approx 70

Il protocollo di misurazione comprende una fase iniziale di ossigenazione massima. L'aggiunta del lievito farà raggiungere un plateau in basso arrivando ad un valore prossimo allo 0% di saturazione di ossigeno. Raggiunto questo livello sarà erogato O_2 fino a raggiungere un valore di $p\text{O}_2 > 10$ kPa. Una volta raggiunta la saturazione massima viene aggiunto sangue e glucosio e si aspetta ancora il plateau basso. Questo processo viene ripetuto per i tre mix di fantoccio liquido ottenuti.

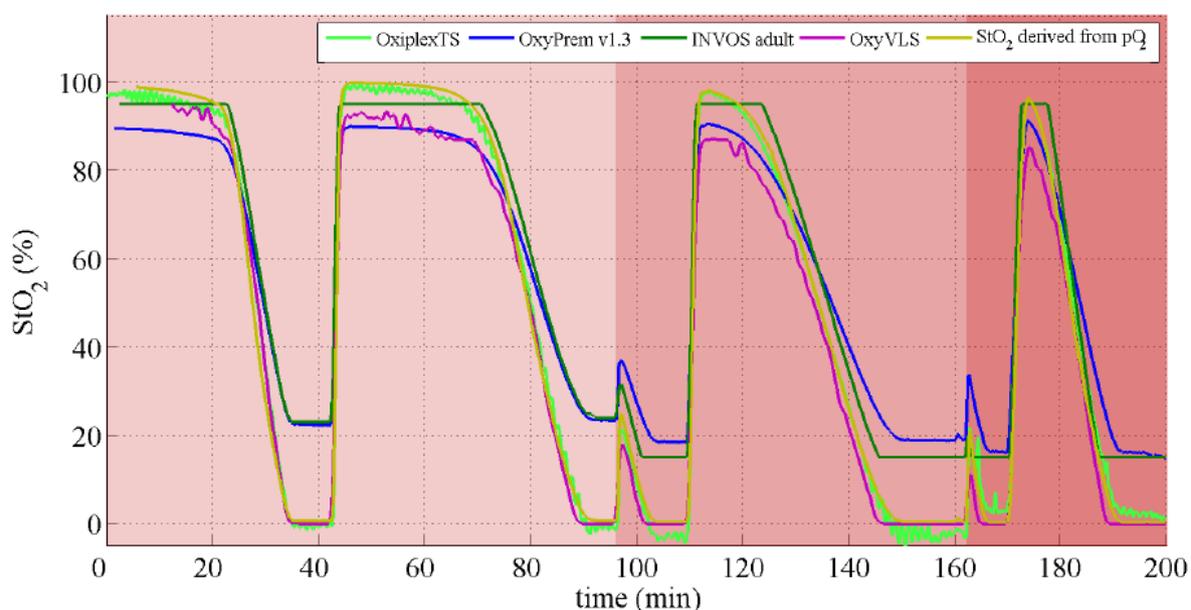


Figura 3.13 Andamento StO_2 misurata dagli strumenti nel tempo durante la deossigenazione nel fantoccio 1. Le zone di concentrazione di emoglobina totale crescente in background con colore rosso.[39]

Come si evince dalla figura 3.13 riguardante il fantoccio 1 le misurazioni ottenute sono linearmente correlate all'andamento della StO_2 nel tempo. I differenti ossimetri hanno mostrato

però differenti calibrazioni e range di sensitività. I risultati ottenuti tramite l'utilizzo dell'equazione di Hill e dei sensori di pressioni parziali, non sono soddisfacenti nel fantoccio 2, invece perché vi è una elevata deviazione tra i valori di StO_2 ricavati dalla pO_2 dovuta molto probabilmente all'aggiunta di una quantità eccessiva di lievito ed a variazioni di pH durante le misurazioni. L'utilizzo di un metodo di co-ossimetria tramite gas analyzer descritto per la validazione del NIRO-300 [33] non è stato utilizzato perché di difficile applicazione, anche se è il metodo più accurato per ricavare il valore assoluto di StO_2 .

La c_{tHb} e le sue variazioni nel tempo hanno dimostrato come la sensibilità, il range dinamico ed i plateau dipendano dagli ossimetri analizzati e dalle loro specifiche tecniche, come ad esempio le lunghezze d'onda utilizzate. Infatti, strumenti come l'Oxiperm v1.3 utilizzando quattro lunghezze d'onda sia meno soggetto alla variabilità del segnale, evento che invece accade nel caso di INVOS che possiede due sole lunghezze d'onda. In alcuni tipi di ossimetri, per via delle lunghezze d'onda utilizzate, ci potrebbero essere misurazioni dovute alla maggiore quantità di lipidi o ad una maggiore capacità dell'acqua e dell'emoglobina di assorbire energia a lunghezze d'onda maggiori di 870 nm. La scelta delle lunghezze d'onda quindi risulta cruciale in questo tipo di applicazioni. L'OxiplexTS ad esempio ha una funzione che permette di calibrarlo in fase iniziale indicando il contenuto di acqua all'interno del fantoccio quindi fornisce nel fantoccio 1 risultati comparabili a quelli ricavati dalla pO_2 .

3.4 Analisi SWOT

Di seguito viene effettuata l'analisi SWOT utilizzata per indicare punti di forza (strengths), debolezze (weaknesses), opportunità (opportunities) e minacce (threats) della realizzazione in laboratorio di un fantoccio con proprietà ottiche umane ed un sistema emodinamico dinamico, in grado di variare l'ossigenazione dei tessuti in tempo reale. Si vuole indicare il Politecnico di Torino come l'azienda che gestisca la realizzazione del fantoccio.

PUNTI DI FORZA	PUNTI DI DEBOLEZZA
<ul style="list-style-type: none"> • Possesso di tecnologie necessarie per lo sviluppo del fantoccio. • Possesso dei laboratori per la progettazione e costruzione del fantoccio. 	<ul style="list-style-type: none"> • Necessità di autorizzazione da Ente esterno all'utilizzo di sangue umano in laboratorio.
OPPORTUNITÀ	MINACCE
<ul style="list-style-type: none"> • Possibilità di comparazione di diversi dispositivi NIRS. • Possibilità di comparare metodi di analisi segnali diversi • Possibilità di comparare metodi di classificazione dati diversi • Possibilità di indagare più efficacemente l'accoppiamento neuro-vascolare • Possibilità di indagare più efficacemente su malattie neurodegenerative • Possibilità di entrata nel mercato con concessione gratuita. • Possibilità di entrata nel mercato tramite vendita del prodotto. 	<ul style="list-style-type: none"> • Mancata uniformità di metodi di standardizzazione. • Presenza sul mercato di Fantocci di validazione NIRS anche se non standardizzati.

Questo tipo di analisi permette di analizzare quali siano i fattori interni ed esterni da valutare per la progettazione e costruzione di un fantoccio da parte del laboratorio del dipartimento DET (*Dipartimento di Elettronica e Telecomunicazioni*) del Politecnico di Torino. I fattori interni riguardano tutte le operazioni e le informazioni che possono essere gestite all'interno dell'organizzazione, sulle quali colui che effettua l'analisi è a conoscenza ed ha modo di modificare per utilizzare al meglio i punti di forza e contenere le debolezze. Nel nostro caso si riguardano gli elementi della prima riga in tabella. I fattori esterni, invece nella seconda riga, sono gli eventi che il mandante non può far altro che prevedere e quindi sono le maggiori opportunità, ma anche i più grandi rischi.

3.5 Considerazioni finali fantocci di calibrazione

La progettazione di un fantoccio, richiede quindi uno studio ben approfondito delle caratteristiche geometriche e dei materiali che andranno a simulare a simulare gli strati della testa umana. Ciò che però risulta tutt'oggi problematico e di difficile approccio, tra uno studio

di ricerca ed un altro, risiede nel riuscire a conferire dinamicità al sistema. La dinamicità e la simulazione della risposta emodinamica sono il principale l'obiettivo che diversi gruppi di ricerca nell'ambito del fNIRS si prefiggono di raggiungere e standardizzare. Tutt'ora, il sistema utilizzato da Hamamatsu nel 1999 che ha conferito la conformità al commercio al NIRO-300 viene preso come esempio,[33] apportandone modifiche e cercando di migliorarlo. La struttura di container, con all'interno un fantoccio liquido, viene utilizzata spesso e modificata, cercando di ricavare i valori di riferimento o tramite emogasanalisi applicando uno strumento come un BGA su una parete del container o tramite una combinazione di sensori in grado di effettuare ossimetria ricavando i valori di ossigenazione tramite pressioni parziali. Il metodo di ossigenazione e di deossigenazione è un'ulteriore componente fondamentale da analizzare. È la componente che conferisce dinamicità al fantoccio, quindi è particolarmente importante soffermarsi su quale sia l'approccio migliore. L'utilizzo del normale lievito si è rivelato essere migliore in termini di prestazioni dell'introduzione di N_2 . I fantocci solidi, d'altro canto non permettono di ottenere dinamicità nel sistema, ma la combinazione con i fantocci liquidi, permette l'analisi delle condizioni appartenenti ad uno stadio di più difficile indagine, come quello neonatale.

Capitolo 4 : Metodo di confronto

4.1 Confronto tra dispositivi

Come già anticipato, il confronto tra dispositivi medici, tra i quali il dispositivo commerciale utilizzato come riferimento, risulta il metodo più utilizzato dalle case produttrici per confermare l'efficacia e l'accuratezza del proprio dispositivo. Attraverso il confronto diretto è possibile anche calibrare il prototipo al fine di ottenere un risultato coerente con quello di riferimento. In fase preliminare al confronto tra dispositivi, abbiamo ricavato per ogni soggetto di studio un output derivato dallo strumento commerciale (*NIRO-200NX*) ed un output del prototipo simulato tramite lo stesso strumento utilizzato in precedenza. Ciò ha permesso di ridurre a zero le differenze tra dispositivi di acquisizione definendo quindi una realtà di base da utilizzare come riferimento, imputando quindi eventuali differenze tra le acquisizioni all'adattamento del soggetto al task. Ha permesso inoltre di capire quali siano i metodi di acquisizione ed analisi dei dati più efficaci che permetteranno poi l'effettivo confronto tra dispositivi diversi.

Il task che il soggetto dovrà eseguire per il confronto tra dispositivi consiste nell'apnea espiratoria. I soggetti devono dichiarare di essere fumatori o meno ed essere in buono stato di salute. La risposta emodinamica cerebrale allo stimolo di apnea espiratoria è uno dei task più semplici da eseguire e consente di ottenere una risposta emodinamica maggiore. È stato ideato un protocollo di validazione delle acquisizioni strutturato in due fasi:

1. acquisizione segnali NRIS
2. analisi e classificazione dei dati.

L'oggetto di studio corrisponde alla risposta emodinamica della corteccia prefrontale a seguito di apnea espiratoria. Questo task induce uno stimolo vasodilatatore perché, nonostante l'ossigeno sistemico subisca una diminuzione, è comunque necessario un corretto afflusso di ossigeno ai neuroni per mantenerlo in costante attività. Ci si aspetterebbe un aumento della CO₂ che non avviene perché viene autoregolata localmente a livello del microcircolo. L'emoglobina legata all'ossigeno aumenta fino a raggiungere un picco indicante la massima dilatazione delle arterie (figura 4.1). Il successivo picco indica l'aumento della frequenza cardiaca. A seguito di questo evento si ha una decrescita repentina denominata apnea compensatoria in cui si ristabilizza ad una condizione pre-stimolo il diametro delle arterie, restringendosi. L'emoglobina deossigenata mantiene un rapporto di anti-correlazione con l'emoglobina ossigenata.

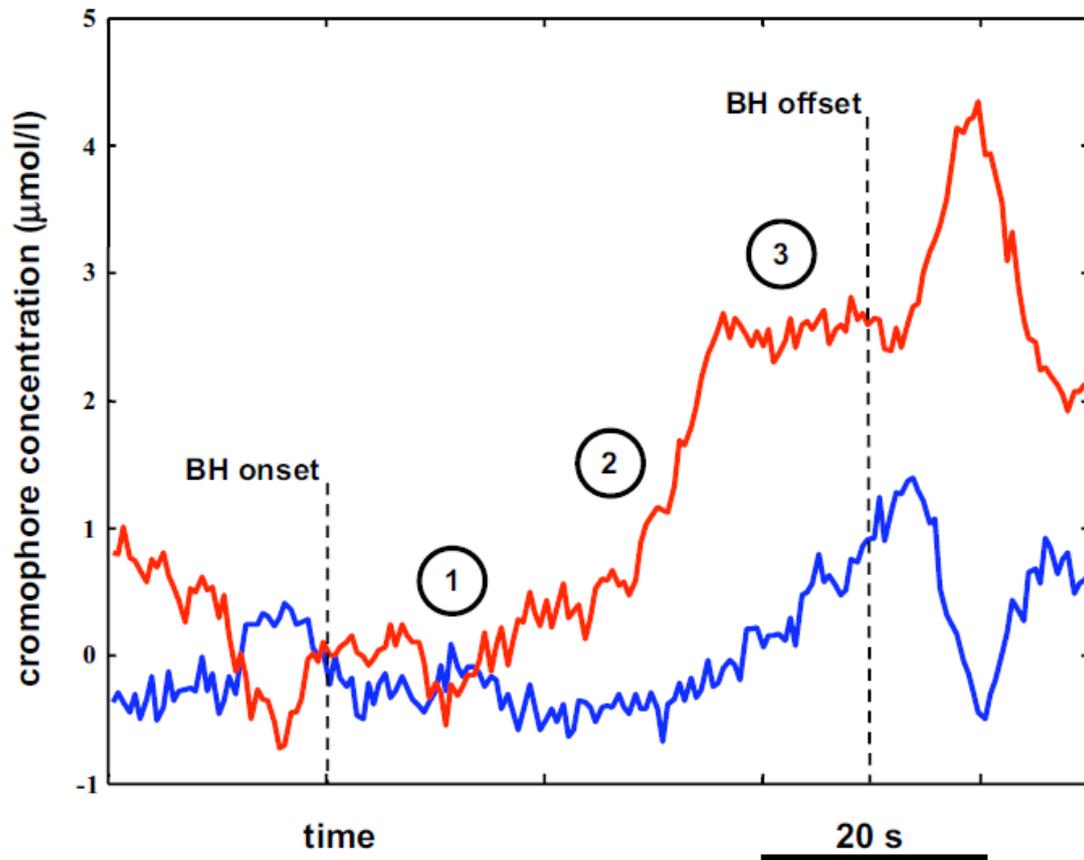


Figura 4.1 le concentrazioni di O₂Hb (in rosso) e HHb (in blu) durante task di apnea espiratoria (BH). 1) corrisponde ad una fase di valore simile a quello della baseline o condizione di riposo. 2) Vi è una risposta vascolare con un forte incremento di O₂Hb. 3) Fine della risposta vascolare con raggiungimento di un plateau ed un ulteriore picco dovuto all'aumento della frequenza cardiaca.[41]

4.2 Protocollo di acquisizione segnali

Lo scopo dell'ideazione di un protocollo di acquisizione dei segnali è quello di cercare di uniformare quanto più possibile le acquisizioni ottenute in laboratorio dai diversi soggetti. Per effettuare la validazione viene eseguito un task di apnea espiratoria (breath-holding) con lo strumento NIRS *NIRO-200NX*. La valutazione dei risultati ottenuti dal classificatore, ha permesso di trarre conclusioni riguardo l'effettiva utilità dell'utilizzo del *k*-means per la validazione del prototipo NIRS. Il protocollo di acquisizione dei segnali ideato non è stato utilizzato per mancanza del prototipo NIRS al momento della stesura dello stesso. È stato necessario modificare il protocollo simulando il prototipo NIRS tramite l'utilizzo del dispositivo *NIRO-200NX*. In appendice segue al protocollo il documento "Scheda NIRS" con il quale sono stati appuntati gli eventi significativi durante le acquisizioni.

Le acquisizioni si sono tenute nel Dipartimento di Elettronica e Telecomunicazioni del Politecnico di Torino, Corso Castelfidardo 42° A, III piano al mattino dopo una colazione

leggera. I soggetti che hanno partecipato all'acquisizione dei segnali hanno dichiarato di essere in stato di buona salute e se fumatori o meno. Sono effettuate misurazioni di Consumo metabolico cerebrale della *corteccia prefrontale destra* (PFC-Dx) e della *corteccia prefrontale sinistra* (PFC-Sx) in configurazione dual-channel mediante NIRS durante "Breath-holding" task. Sono posizionati emettitori e ricevitori a 4 cm l'uno dall'altro mediante alloggiamento schermante in dotazione, fissati ad una altezza di circa 1 cm al di sopra dell'arcata sopraccigliare tramite nastro biadesivo e mantenuti in posizione mediante una fascia elastica. Sono compresi tra emettitore e ricevitore la posizione Fp1 per la PFC-Sx sul canale 1 (CH1) e Fp2 per la PFC-Dx sul canale 2 (CH2). Queste due posizioni sono riconosciute nel "sistema internazionale 10-20" (10-20 Electrode Placement System) come mostrato in figura 4.2.

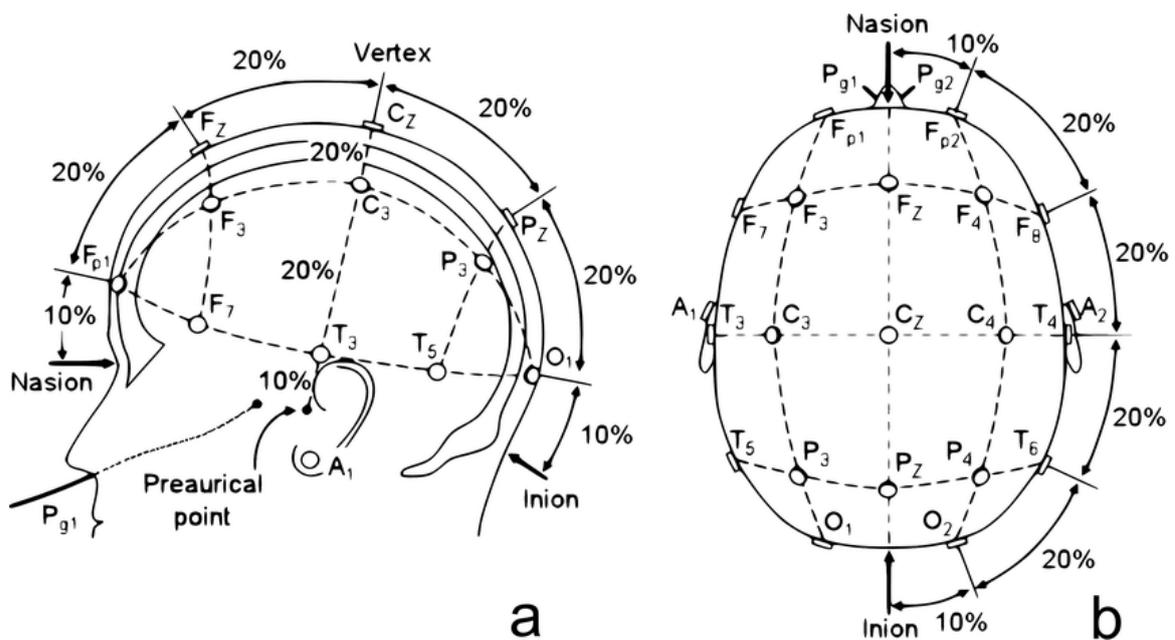


Figura 4.2 "sistema internazionale" 10-20. Vista piano sagittale (a sinistra). Vista piano trasverso(a destra).[42]

Le misurazioni sono effettuate mediante strumento NIRS NIRO-200NX. Durante le misurazioni il soggetto siede su di una sedia con altezza regolabile a seconda della propria altezza; piedi appoggiati a terra con base allargata e stabile, schiena diritta e mani appoggiate sulla scrivania posta di fronte. La posizione deve garantire la massima comodità ed ergonomia al soggetto.

La durata del ciclo di registrazione dipende dal tempo di apnea raggiunto dal soggetto di che in media si attesta sui 35'' e dal periodo di riposo (rest) utile per garantire il ritorno effettivo alle condizioni basali delle concentrazioni di emoglobina.. Sul soggetto vengono poste le sonde del dispositivo seguendo le posizioni indicate prima. A schermo vengono visualizzati i valori di indice di saturazione del tessuto (TOI) per ogni canale. Il dispositivo viene considerato posizionato correttamente se i valori di TOI per ogni canale rimangono stabili sopra il 70%.

Il mancato raggiungimento della stabilità di tale valore rende necessario il riposizionamento delle sonde. Posizionato correttamente gli emettitori ed i ricevitori sul soggetto si effettuano due prove di apnea espiratoria per valutare il corretto svolgimento del task da parte del soggetto, indicandogli come meglio procedere e per valutare l'effettiva presenza di risposta emodinamica a task. Verificati questi punti, è possibile procedere con l'acquisizione dei segnali.

In figura 4.3 vi è una rappresentazione del ciclo di registrazione per una durata complessiva di 35'.



Figura 2.3 Schema del ciclo di registrazione. Il posizionamento delle sonde dello strumento NIRO-200NX e la verifica del corretto funzionamento ha una durata di circa 8' a seconda del soggetto (in arancione). Successivamente segue l'esecuzione del task di apnea espiratoria seguito da una fase di riposo che varia da soggetto a soggetto. In media sono necessari 2' dopo l'esecuzione del task. Questi ultimi due blocchi sono ripetuti 10 volte.

Il task di apnea espiratoria viene effettuato nel seguente modo. Il soggetto, quando è pronto ad effettuare il task, effettua 3 cicli completi di respirazione. Effettuata l'ultima espirazione che non deve essere profonda, deve fermarsi in apnea dopo aver svuotato i polmoni. Se il soggetto ha necessità, può tapparsi il naso con la mano. Una volta avvertito lo sforzo e quindi la necessità di respirare, il soggetto può tornare a respirare regolarmente. Al fine di standardizzare le acquisizioni ed avere la durata dei task il meno variabile possibile, l'operatore annuncia il tempo passato dall'inizio del Task a passi di 10''. Contemporaneamente e per tutta la durata del test, verranno eseguite le misurazioni NIRS in configurazione dual-channel sulla PFC.

È compito dell'operatore il posizionamento dei ricevitori ed emettitori dello strumento NIRS. Per il task effettuato, l'operatore che esegue le misurazioni deve assicurarsi di porre i marker di inizio e fine task sul dispositivo NIRS in esame in modo da facilitare l'elaborazione del segnale offline. Questi marker sono anche segnati su uno specifico documento indicante le dieci prove effettuate per ogni soggetto. Deve inoltre istruire i soggetti riguardo le misurazioni e guidarli ad una corretta esecuzione dei task. Durante la fase di posizionamento, sarà compito dell'operatore verificare il corretto posizionamento dello strumento analizzando il TOI. Dovrà poi spiegare e far eseguire al soggetto il task ed accertarsi che su schermo sia rappresentata la risposta emodinamica al task.

4.3 Metodologia analisi dei segnali

I segnali ottenuti dallo strumento NIRS NIRO-200NX sono analizzati tramite Matlab. Il metodo di classificazione scelto per la classificazione dei dati è il *k*-means. Questo tipo di algoritmo divide i dati in un determinato numero di gruppi (cluster) -*k*- preimpostato. Sono state ricavate quindi delle features rappresentanti i segnali e create matrici di dati da utilizzare nell'algoritmo. Ciò che ci aspettiamo è che l'algoritmo non sia in grado di distinguere i due dispositivi in due cluster diversi o che la divisione dei dati nei cluster si basi sulla distinzione tra emoglobina ossigenata e deossigenata assumendo che le differenze tra i comportamenti delle due concentrazioni siano maggiori di quelle tra i due dispositivi. Ciò darà conferma che questo tipo di algoritmo possa essere utilizzato per il confronto tra due dispositivi NIRS diversi, quali il prototipo NIRS ed il NIRO-200NX. Un metodo per definire l'efficacia dell'algoritmo risulta essere il calcolo delle distanze inter- ed intra-cluster (massimizzando le prime e minimizzando le seconde) al fine di ottenere una clusterizzazione corretta ed ottenere dati all'interno dei cluster singoli poco variabili e coerenti tra loro. La seconda ipotesi da confermare ha due varianti: la prima è che un cluster sia molto più popolato rispetto all'altro, indice che nella maggior parte dei casi i dati siano simili tra loro rendendo non distinguibili i dispositivi; la seconda è che avendo suddiviso il dataset in due cluster, vengano riconosciuti all'interno dei diversi soggetti i segnali di emoglobina ossigenata e deossigenata, assegnando il primo cromoforo ad un cluster ed il secondo all'altro. Inoltre sarà necessario dimostrare, analizzando i singoli cromofori, come non vi sia una suddivisione in cluster basata sulla distinzione dei canali rappresentanti i diversi emisferi cerebrali analizzati.

4.3.1 Preprocessing

I dati sono stati importati su Matlab e filtrati tramite filtro passa-basso di ordine 3 con frequenza di taglio a 50 mHz. La frequenza di campionamento del segnale ottenuto da NIRO-200NX è di 2 Hz. I segnali filtrati, sono poi scalati rimuovendo il valore del segnale al tempo del primo marker ed infine plottati per la visualizzazione. In figura 4.4 un esempio di segnale filtrato ottenuto dal secondo soggetto da cui è possibile evincere quale sia la durata dell'intero ciclo di registrazione e di come avvenga la risposta emodinamica nella PFC-SX sul canale 1 e della PFC-DX sul canale 2. Durante il task di apnea espiratoria è possibile notare come vi sia un aumento dei valori di emoglobina ossigenata (in rosso) dovuti al maggior afflusso di ossigeno nella regione. Da notare l'anti-correlazione tra l'emoglobina ossigenata e la deossigenata (in blu) che decresce quando vi è un innalzamento della prima. A fine task e durante la fase di recupero, vi è un aumento dell'emoglobina deossigenata ed una diminuzione della ossigenata.

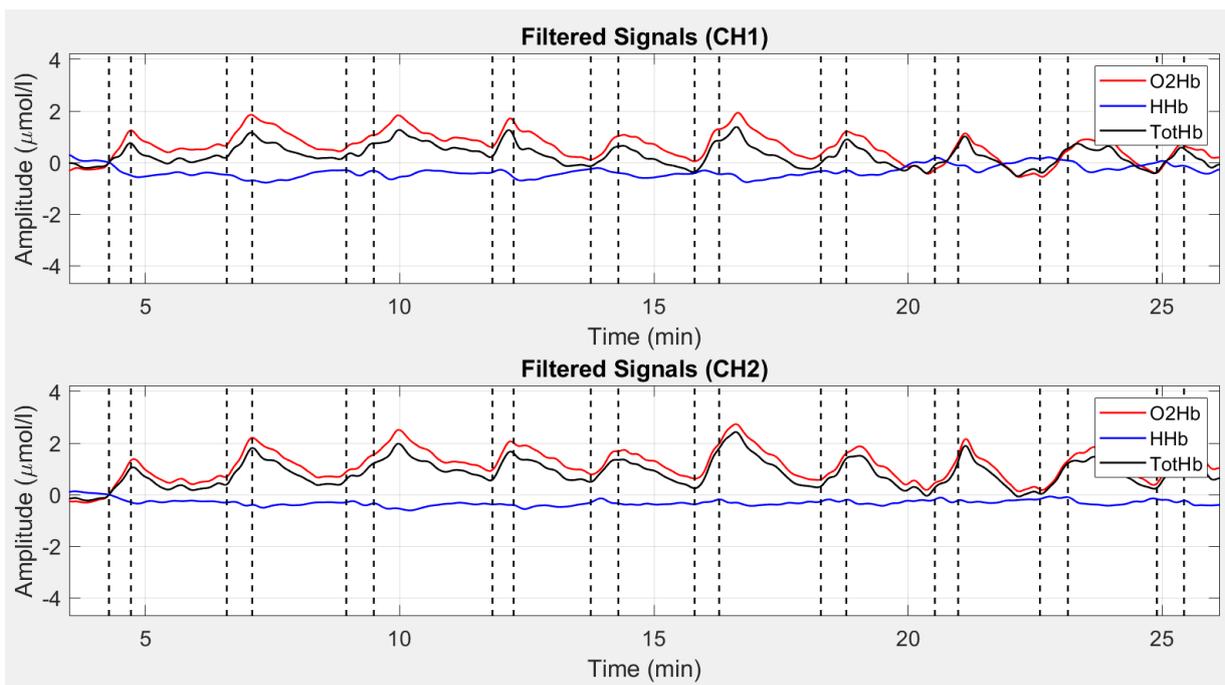


Figura 4.4 Segnali filtrati ottenuti dal soggetto 2. I marker di inizio e fine task sono indicati tramite linee verticali tratteggiate. L'emoglobina ossigenata (in rosso) e l'emoglobina deossigenata (in blu). I valori di Ampiezza delle concentrazioni dei cromofori sono riportati in $\mu\text{mol/l}$. l'asse dei tempi è riportata in minuti.

Ai segnali è stato poi effettuato detrending, rimuovendo ad ognuno il valore medio dell'ampiezza calcolato sui 6 secondi successivi alla fine dei ogni task, al fine di eliminarne il trend crescente. Il segnale quindi su cui poter ricavare le caratteristiche viene mostrato in figura 4.5.

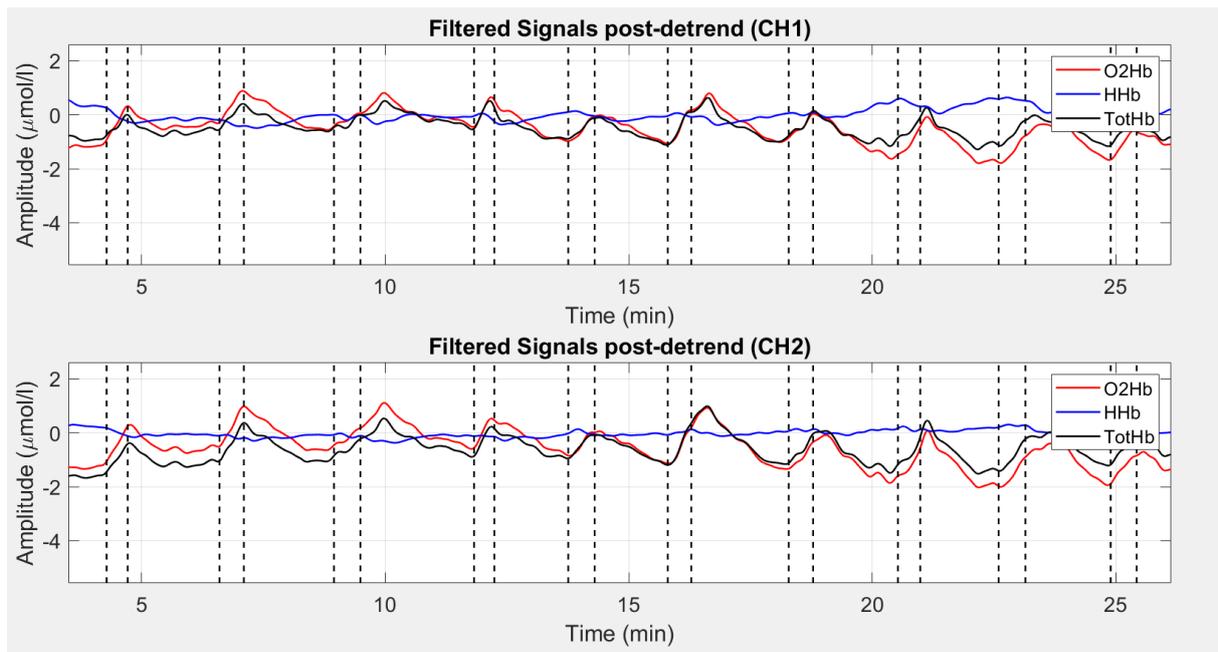


Figura 4.5 Segnali filtrati dopo aver effettuato detrending del soggetto 2. I marker di inizio e fine task sono indicati tramite linee verticali tratteggiate. L'emoglobina ossigenata (in rosso) e l'emoglobina ossigenata (in blu). I valori di Ampiezza delle concentrazioni dei cromofori sono riportati in $\mu\text{mol/l}$. l'asse dei tempi è riportata in minuti.

La selezione delle caratteristiche (features) da dare in pasto all'algoritmo di classificazione sono ricavate sia per il segnale di emoglobina ossigenata, sia per il segnale di emoglobina deossigenata per entrambi i canali. È necessario calcolarle utilizzando una finestra temporale di osservazione [43]. La finestra di osservazione selezionata coincide con il marker di inizio task a cui sono sottratti 2 secondi fino al marker di fine task a cui sono aggiunti 6 secondi. [44] Corrispondono a:

- *Valore medio del segnale*: il valore medio viene calcolato lungo una finestra di osservazione prestabilita per ogni task svolto
- *Picco del segnale*: viene individuato il picco dei segnali in una finestra di tempo comprendente la risposta dovuta al task, evitando il picco raggiunto per via dell'aumento della frequenza cardiaca per quanto riguarda l'emoglobina ossigenata
- *Pendenza (slope) del segnale*: viene calcolata la pendenza del segnale durante l'esecuzione del task di apnea espiratoria [45]
- *Minimo del segnale*: viene calcolato il valore minimo raggiunto dai segnali in una finestra di tempo prestabilita. Fisiologicamente, questo minimo è atteso entro i 2 secondi dall'inizio della risposta emodinamica
- *Skewness* [46]
- *Kurtosis* [46]

- *Deviazione standard del segnale*: viene calcolata la deviazione standard dei segnali in una finestra temporale prestabilita
- *Errore quadratico medio*: viene calcolata l'errore quadratico medio dei segnali in una finestra temporale prestabilita
- *Varianza*: viene calcolata la varianza dei segnali in una finestra temporale prestabilita.

Sono state create due matrici la cui prima inerente ai valori ottenuti dai 2 soggetti non fumatori, mentre la seconda inerente la totalità dei tipi di soggetti. Sulle colonne è possibile trovare le variabili, ovvero le features, mentre sulle righe sono presenti le osservazioni.

La Matrice 1 (2 soggetti non fumatori) è composta da 10 colonne indicanti le variabili in esame (features) e in riga dalle seguenti osservazioni:

- Riga 1-10 : variabili estratte dal segnale O₂Hb_CH1 del soggetto 1
- Riga 11-20 : variabili estratte dal segnale O₂Hb_CH2 del soggetto 1
- Riga 21-30 : variabili estratte dal segnale HHb_CH1 del soggetto 1
- Riga 31-40 : variabili estratte dal segnale HHb_CH2 del soggetto 1

Questa identica configurazione viene ripetuta dalle riga 41-80 per quanto riguarda il soggetto 2.

La Matrice 2 (3 soggetti) è composta da 10 colonne rappresentanti le variabili in esame (features) e in riga dalle 120 osservazioni seguendo lo schema della Matrice 1. Da riga 1-40 vi è il soggetto 1, da riga 41-80 vi è il soggetto 2, da riga 81-120 vi è il soggetto 3 (fumatore). Le matrici di features e osservazioni ottenute, sono state normalizzate seguendo il metodo *MinMax* (6).

$$x_{norm} = \frac{x - \min(x)}{\max(x) - \min(x)}$$

Equazione 6

Le features normalizzate sono state utilizzate all'interno dell'algoritmo di *k-means* valutando quale sia stata la risposta del dispositivo alle ripetute misurazioni.

4.3.2 K-means

Il metodo del *k-means* ha lo scopo di classificare i dati in un numero $-k-$ di cluster definito a priori. I *cluster* rappresentano i gruppi nei quali gli oggetti sono divisi e classificati in base alla loro somiglianza. I dati da classificare e raggruppare all'interno dei cluster sono definiti *data points* (dati del database). L'algoritmo quindi analizzerà i dati a disposizione classificandoli in base alla distanza Euclidea dal *centroide* del cluster. Il *centroide* è definito come il valore medio del cluster. Tramite questo metodo viene minimizzata la varianza all'interno dei singoli cluster per essere certi che gli elementi all'interno di un cluster non differiscano tra loro.

I principali attori di questo tipo di algoritmo sono:

1. *Centroide (prototipo)*: corrisponde alla media di tutti i valori all'interno del cluster.
2. *Variabilità intra-cluster*: corrisponde alla somma di tutte le distanze tra ogni elemento appartenente al cluster ed il centroide del cluster.
3. *Distanza inter-cluster*: corrisponde alla distanza tra i rispettivi centroidi dei due cluster.

Questo algoritmo è definito iterativo, perché vengono ripetuti alcuni step in successione fino ad arrivare a convergenza, ovvero la condizione di stop per cui tutti gli elementi del dataset sono stati correttamente classificati ed associati ad un cluster minimizzando la variabilità intra-cluster e massimizzando la distanza inter-cluster. Gli step da seguire sono:

1. *Inizializzazione*: nella prima fase dell'algoritmo viene definito il $-k-$ numero di cluster in cui suddividere e classificare i data points.
2. *Creazione clusters*: vengono ora assegnati i dati casualmente ai cluster.
3. *Calcolo dei centroidi*: sono calcolati ora i centroidi. Ogni cluster presenterà quindi un centroide come media dei valori dei dati all'interno del cluster.
4. *Riassegnazione elementi dei cluster*: viene calcolata la distanza euclidea tra ogni elemento del cluster ed ogni centroide. Ogni data point sarà quindi riassegnato al cluster la cui distanza euclidea si minore rispetto a i restanti centroidi.
5. *Condizione di stop*: essendosi aggiornati i cluster, vengono ripetuti gli step 3 e 4 fino ad arrivare alla condizione di stop, nel quale la variabilità intra-cluster si sia minimizzata e la distanza inter-cluster si sia massimizzata.

In figura 4.6 viene spiegato graficamente il metodo del *k-means*:

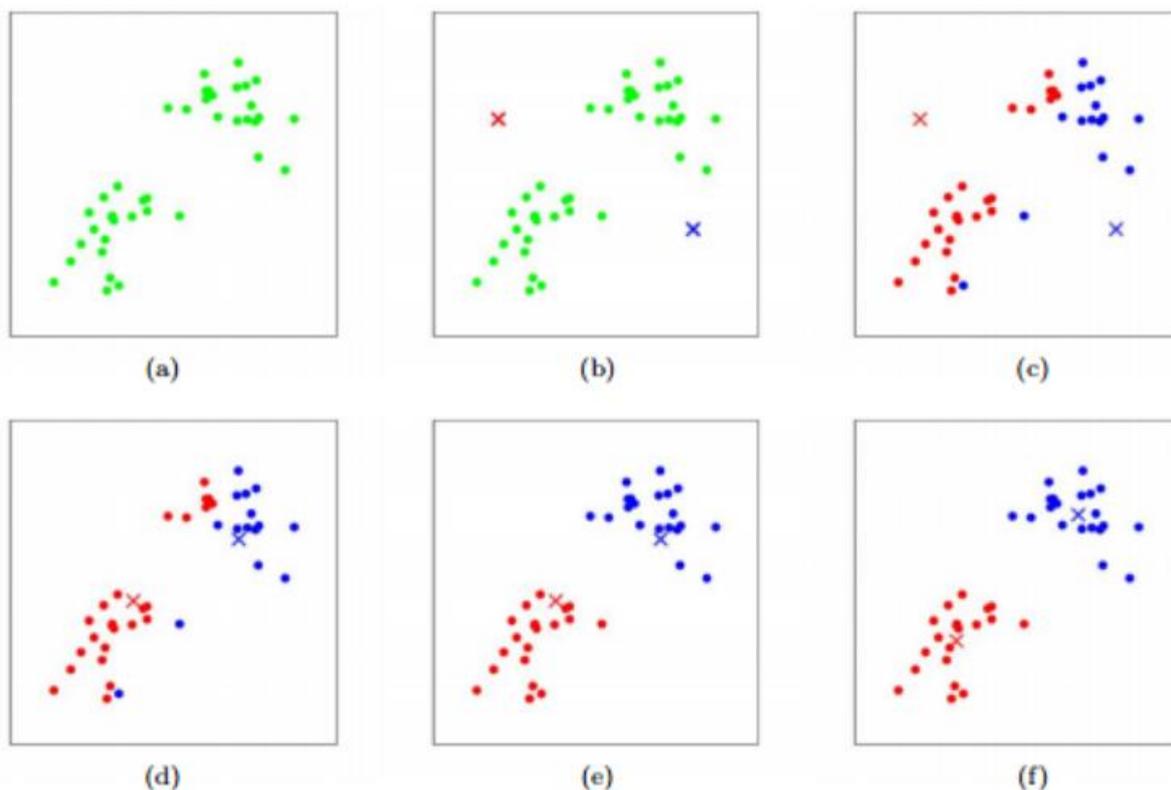


Figura 4.6 Algoritmo *k*-means. Il data points è definito in (a) tramite punti verdi. In (b) viene mostrata la selezione casuale di due punti che saranno definiti centroidi dei cluster. In (c) avviene la separazione dei dati in due cluster a seconda del calcolo della distanza Euclidea tra i centroidi e tutti gli elementi del dataset. Ad ogni iterazione successiva (d-e-f) sono riassegnati i centroidi come media dei nuovi cluster aggiornati e sono ricalcolate le distanze Euclidee al fine di minimizzare la variabilità intra-cluster e massimizzare le distanze inter-cluster confermando la condizione di stop e giungendo a convergenza. [47]

4.4 Risultati

4.4.1 dataset in input: dataset totale

Analizzando i risultati della figura 4.7 e della figura 4.8, è possibile notare come la distinzione dei dati nei due cluster sia comandata dal cromoforo da cui sono stati estratte le features indicando come Cluster 2 (CL2) i dati appartenenti all'emoglobina ossigenata, mentre Cluster 1 (CL1) i dati appartenenti all'emoglobina deossigenata. Nell'istogramma in figura 4.7 si evince come il dataset composto dalle 40 osservazioni per ogni soggetto venga suddiviso nei due cluster. Nel soggetto 1 vi è la perfetta suddivisione delle osservazioni in due cluster di identica capienza, mentre nel soggetto 2 vi sono 23 osservazioni che ricadono nel cluster 1 e le restanti 17 nel cluster 2.

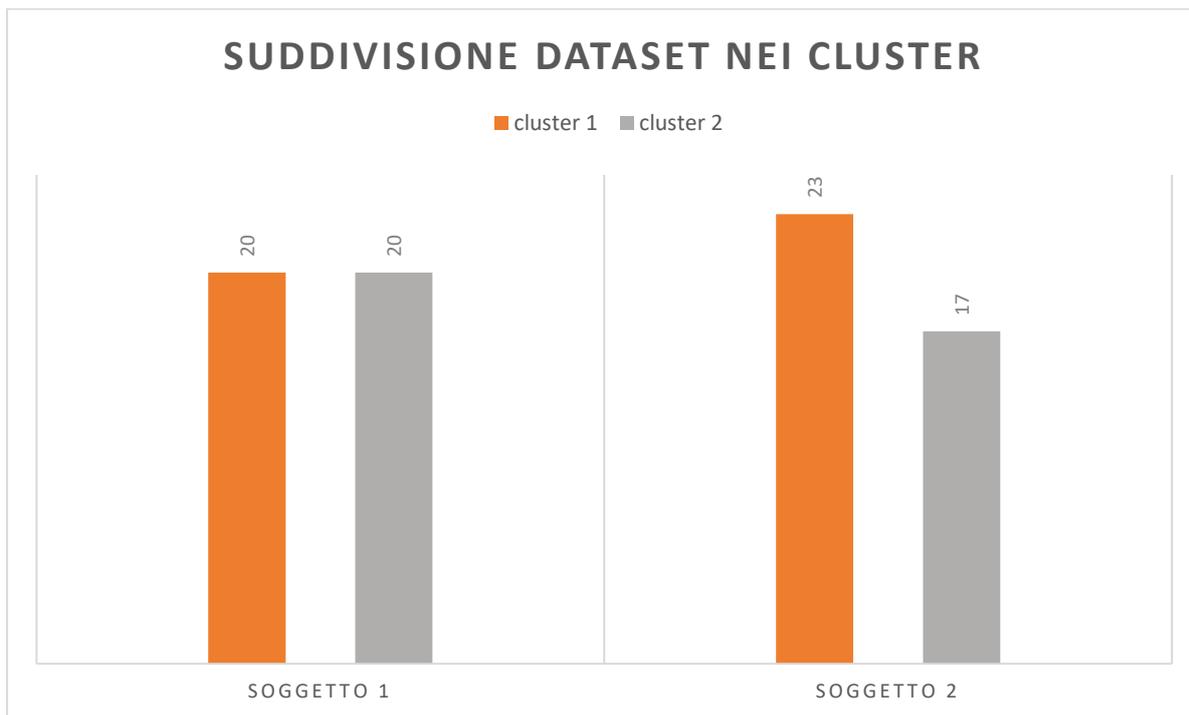


Figura 4.7 nell'istogramma sono riportati i risultati della classificazione tra i due soggetti non fumatori. In arancione sono riportati gli elementi appartenenti al cluster 1 per ognuno dei soggetti. In grigio sono riportati gli elementi del cluster 2 per ognuno dei soggetti.

Nella figura 4.8, viene rappresentata l'assegnazione dei cromofori ai cluster.

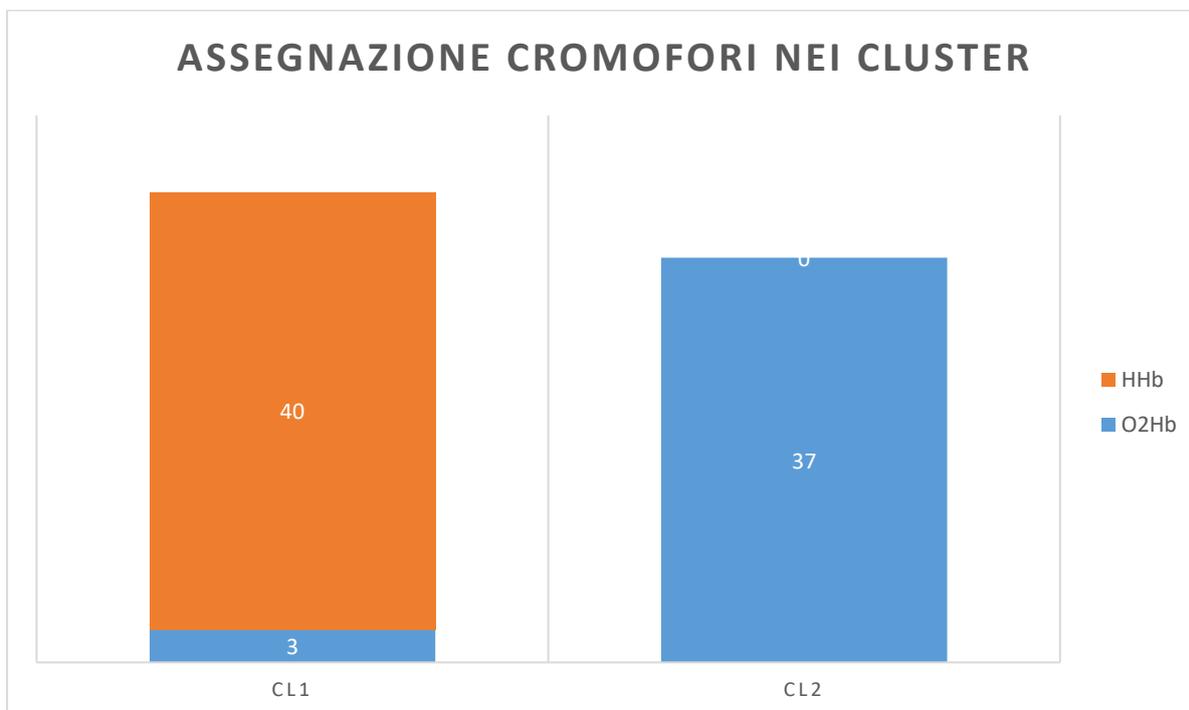


Figura 4.8 Assegnazione dei cromofori HHb (in arancione) e O2Hb (in blu) nei due cluster. Cluster 1 (CL1) in cui sono state classificate le osservazioni di emoglobina deossigenata. Cluster 2 (CL2) in cui sono state assegnate le osservazioni di emoglobina ossigenata.

Nella confusion matrix in tabella 4.1 viene rappresentata l'accuratezza della classificazione. Quindi in base alla clusterizzazione effettuata è stato possibile ottenere un'accuratezza nella classificazione del 96,25% calcolata come la somma dei valori sulla diagonale principale della tabella diviso il totale delle osservazioni. Per quanto riguarda la classificazione dell'emoglobina deossigenata, tutte le osservazioni ricadono nel cluster 1 (CL1). Vi è una percentuale di falsi positivi, definiti come i valori di emoglobina ossigenata classificati come emoglobina deossigenata, classificati nel cluster errato (CL2), che si attesta al 3,75%.

Tabella 4.1 Confusion matrix inerente l'accuratezza del classificatore. Nelle colonne sono riportati i valori reali, mentre ogni riga rappresenta i valori predetti.

		REALI		
		CLUSTER 1	CLUSTER 2	TOT
PREDETTI	CLUSTER 1	40	0	40
	CLUSTER 2	3	37	40
	TOT	43	37	80

Nella figura 4.9 è mostrata la clusterizzazione con il secondo dataset nel quale è presente un soggetto 3 fumatore. Si nota come la classificazione dei cromofori appartenenti al soggetto 1 e soggetto 2 rimanga invariata, mentre la suddivisione degli elementi appartenenti al soggetto 3 presenta una maggiore discrepanza rispetto ai due soggetti non fumatori.

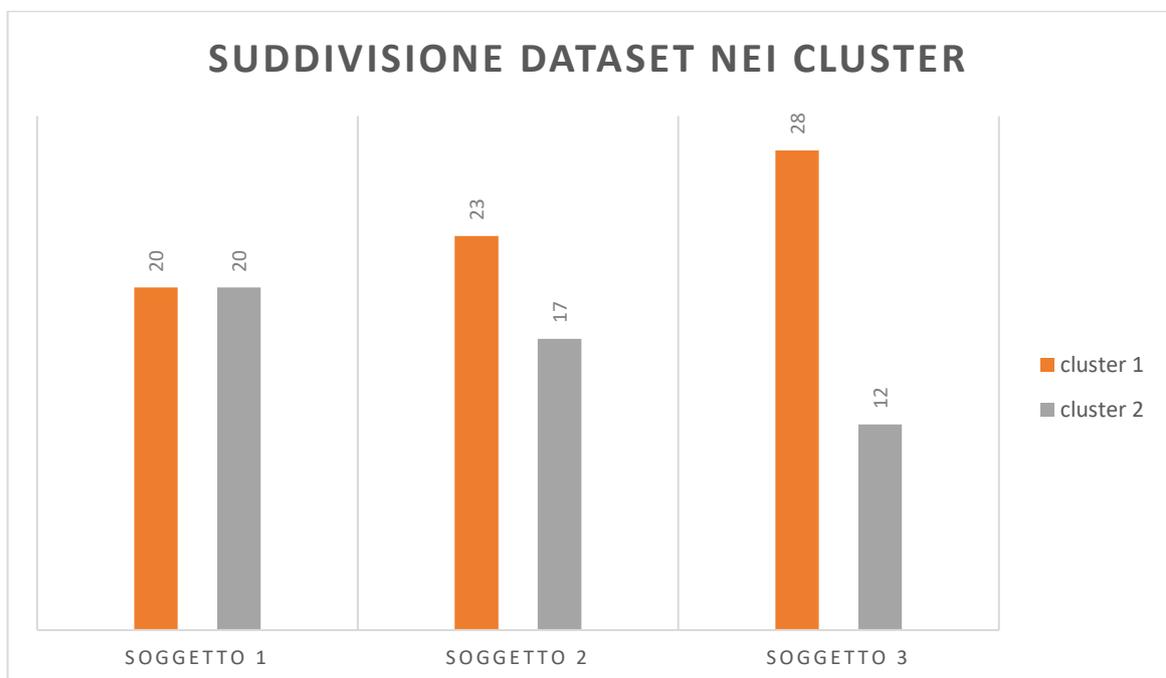


Figura 4.9 nell'istogramma sono riportati i risultati della classificazione tra i 3 soggetti di cui il soggetto 3 è fumatore. In arancione sono riportati gli elementi appartenenti al cluster 1 per ognuno dei soggetti. In grigio sono riportati gli elementi del cluster 2 per ognuno dei soggetti.

Nella figura 4.10, viene rappresentata l'assegnazione dei cromofori ai cluster ed è possibile notare che 11 elementi di O₂Hb siano stati classificati come HHb.

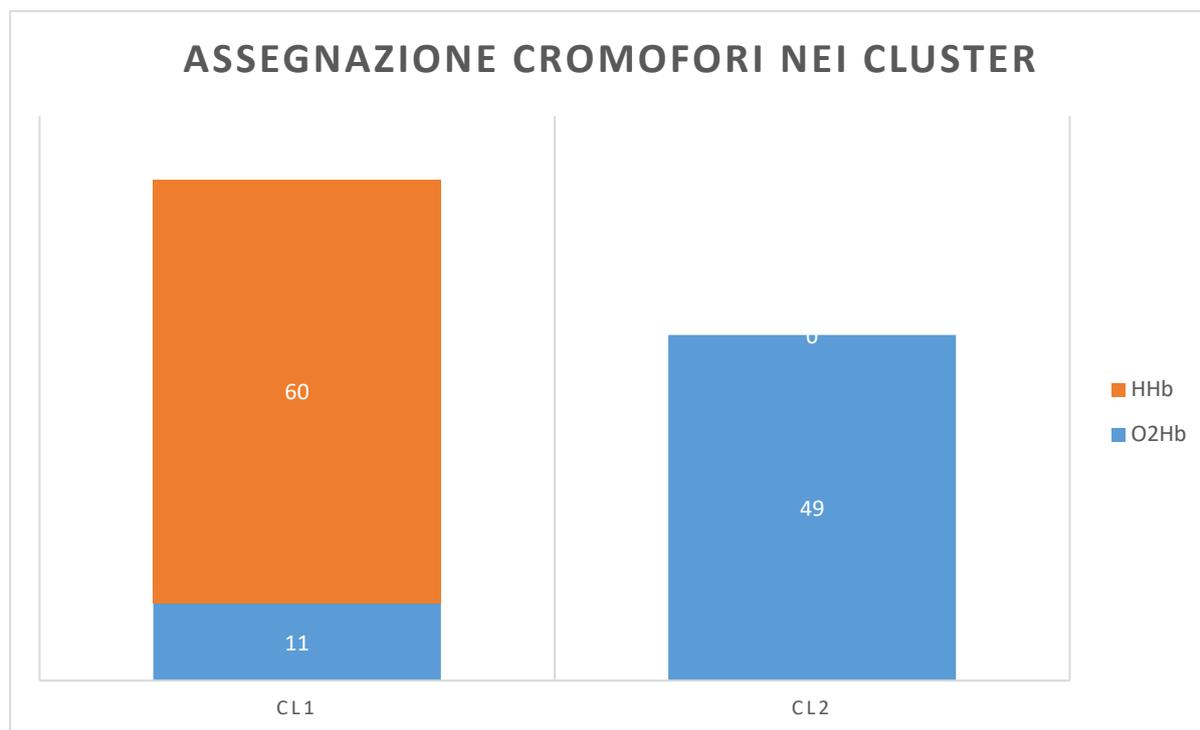


Figura 4.10 Assegnazione dei cromofori HHb (in arancione) e O₂Hb (in blu) nei due cluster. Cluster 1 (CL1) in cui sono state classificate le osservazioni di emoglobina deossigenata. Cluster 2 (CL2) in cui sono state assegnate le osservazioni di emoglobina ossigenata.

Tabella 4.2 Confusion matrix inerente l'accuratezza del classificatore. Nelle colonne sono riportati i valori reali, mentre ogni riga rappresenta i valori predetti.

		REALI		
		CLUSTER 1	CLUSTER 2	TOT
PREDETTI	CLUSTER 1	60	0	60
	CLUSTER 2	11	49	60
	TOT	71	49	120

In questo caso l'accuratezza del classificatore, come mostrato in tabella 4.2, scende al 81,6% in quanto sono presenti 11 falsi positivi appartenenti al cromoforo O₂Hb che sono classificati nel cluster 1 (CL1). L'emoglobina deossigenata viene classificata come appartenente al cluster 1, mentre è presente un incremento di probabilità che vi siano elementi classificati come falsi positivi al 9,1%.

È stata calcolata tra i soggetti, la variazione media di concentrazione di emoglobina ossigenata e deossigenata durante il task. Anche in questo caso la finestra di osservazione selezionata coincide con il marker di inizio task a cui sono sottratti 2 secondi fino al marker di fine task a cui sono aggiunti 6 secondi. Sono stati individuati i valori di concentrazione dei

cromofori di inizio e fine finestra di osservazione. È stato ricavato il valore assoluto della differenza dei due valori per ogni finestra per effettuarne la media. In figura 4.11 si nota come le variazioni di concentrazione dell'emoglobina ossigenata nei due canali dei soggetti non fumatori rispetto al soggetto fumatore sia circa 3 volte maggiore. Le variazioni di concentrazione di emoglobina deossigenata nei due canali risultano comparabili tra i soggetti. A differenza dei soggetti non fumatori, nel soggetto 3 non vi è una marcata differenza tra la variazione media di concentrazione dell'emoglobina deossigenata con quella ossigenata, rendendo quindi l'interpretazione dei dati più difficoltosa per l'algoritmo.

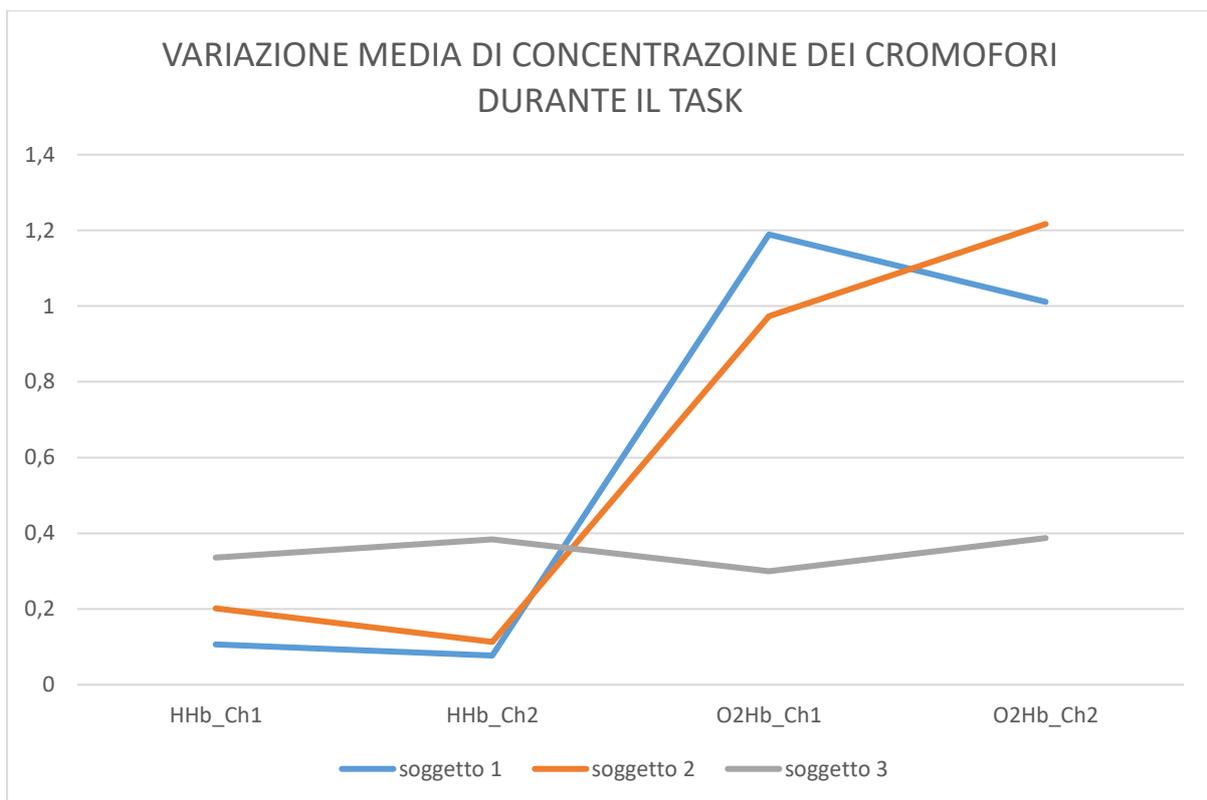


Figura 4.11 Grafico a linee indicante l'incremento medio di concentrazione dei cromofori durante il task. Sulle ascisse le variabili dei cromofori nei canali 1 (Ch1) e 2 (Ch2). Sulle ordinate il valore medio di variazione dei cromofori durante i task ($\mu\text{mol/l}$). Il soggetto 1 in blu, il soggetto 2 in arancione e il soggetto 3 (fumatore) in grigio.

4.4.2 dataset in input: singoli cromofori

Al fine di verificare se le maggiori differenze date dagli input possano essere attribuite alle macchine diverse, sono analizzati singolarmente i cromofori tramite *k*-means.

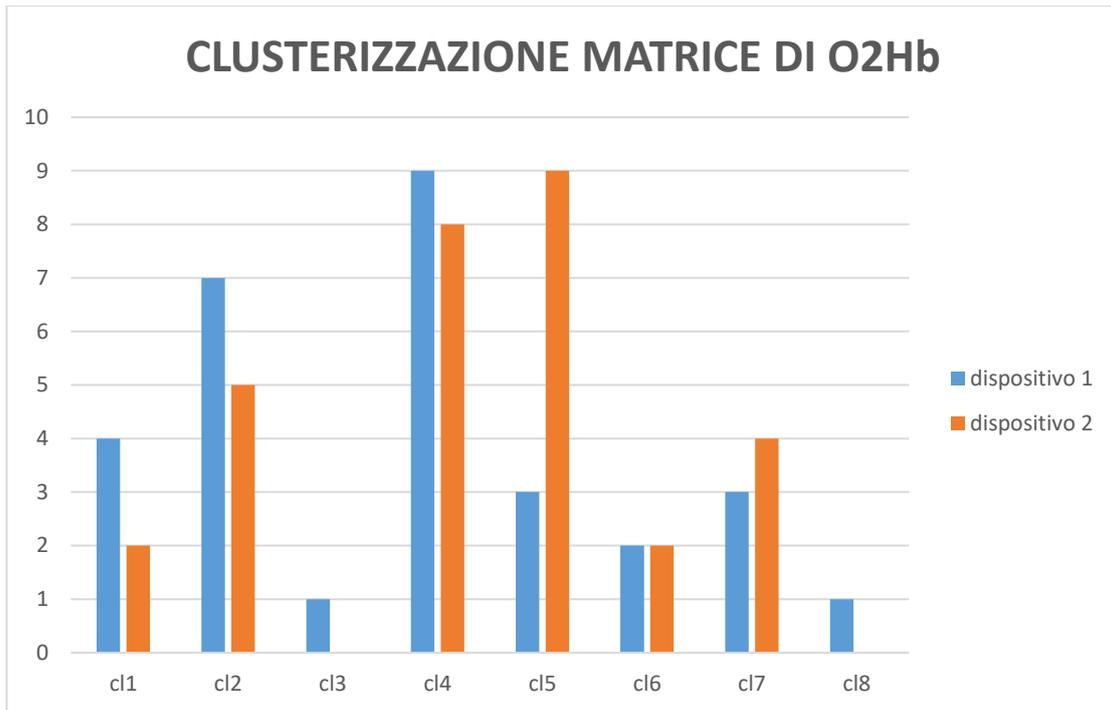


Figura 4.12 Istogramma indicante la clusterizzazione della matrice di O₂Hb in 8 cluster. Distribuzione delle osservazioni appartenenti ai dispositivo 1 (in blu) e del dispositivo 2 (in arancione) nei cluster.

Il numero di cluster selezionato è 8 ed è stato ricavato tramite la funzione “evalcluster” di Matlab, la quale indica quale sia il numero di cluster ottimale per un determinato database. È possibile notare come vi sia una distribuzione non ben definita dei dispositivi all’interno dei cluster.(figura 4.12)

Minimizzando la distanza intra-cluster e massimizzando la distanza inter-cluster è possibile clusterizzare il dataset in 2 gruppi identificando in quale cluster i dispositivi siano stati assegnati. In figura 4.13 si nota come vi siano nel cluster 1 11 osservazioni appartenenti al dispositivo 2 e 13 appartenenti al dispositivo 1. Nel cluster 2 sono presenti 17 osservazioni appartenenti al dispositivo 1 e 19 al dispositivo 2.

CLUSTERIZZAZIONE DEI DISPOSITIVI – O₂Hb

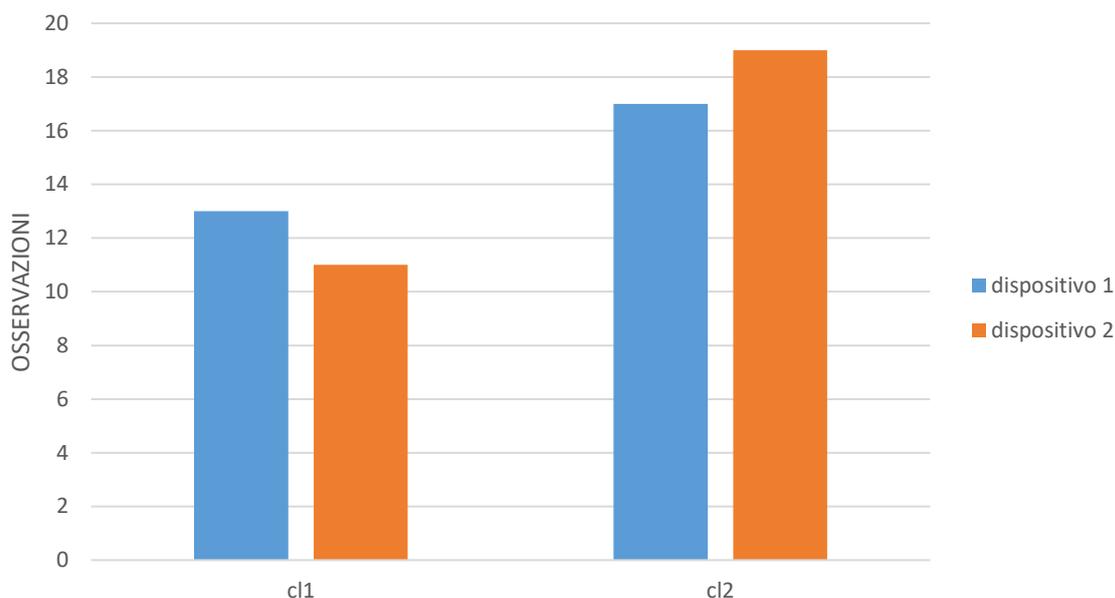


Figura 4.13 Istogramma indicante la clusterizzazione dei dispositivi delle osservazioni di O₂Hb in 2 cluster. Distribuzione delle osservazioni appartenenti ai dispositivo 1 (in blu) e del dispositivo 2 (in arancione) nei cluster.

Al fine di identificare poi se l’algoritmo avesse distinto i cluster in base alle differenze tra gli emisferi, è stata analizzata la composizione dei cluster basandosi sul numero di osservazioni per ogni emisfero all’interno di ogni cluster. (figura 4.14)

CLUSTERIZZAZIONE EMISFERI-O₂HB

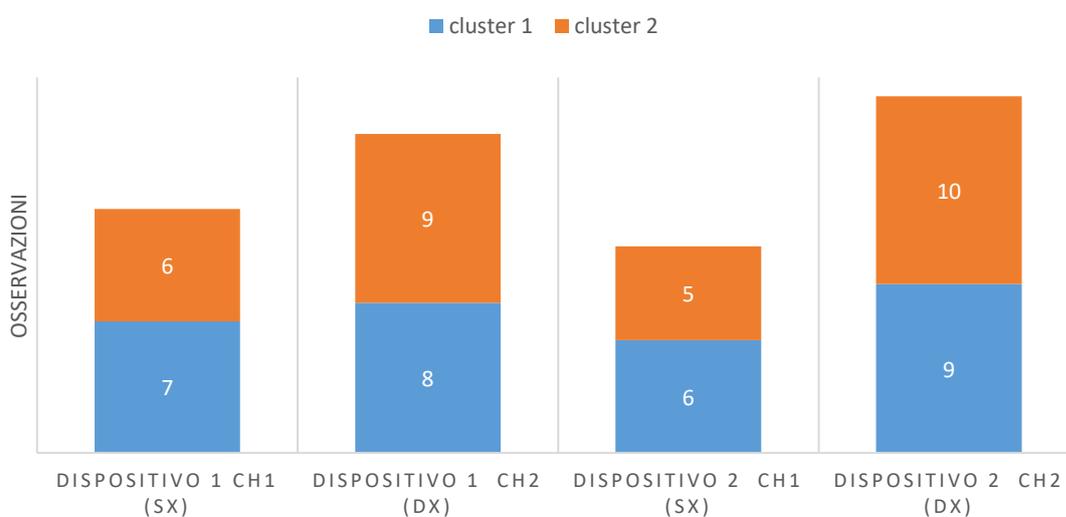


Figura 4.14 Istogramma indicante la clusterizzazione degli emisferi delle osservazioni di O₂Hb in 2 cluster. Distribuzione degli emisferi sinistro (CH1) e destro (CH2) dei dispositivi all’interno dei due cluster.

Gli emisferi si distribuiscono uniformemente all'interno dei cluster, non riuscendo quindi ad ottenere una netta distinzione di essi ed appurando che l'algoritmo non distingue i cluster in base agli emisferi.

I medesimi risultati e considerazioni sono ottenute tramite l'analisi delle osservazioni inerenti l'emoglobina deossigenata. Il numero ottimale di cluster per questo cromoforo è risultato 5. (figura 4.15)

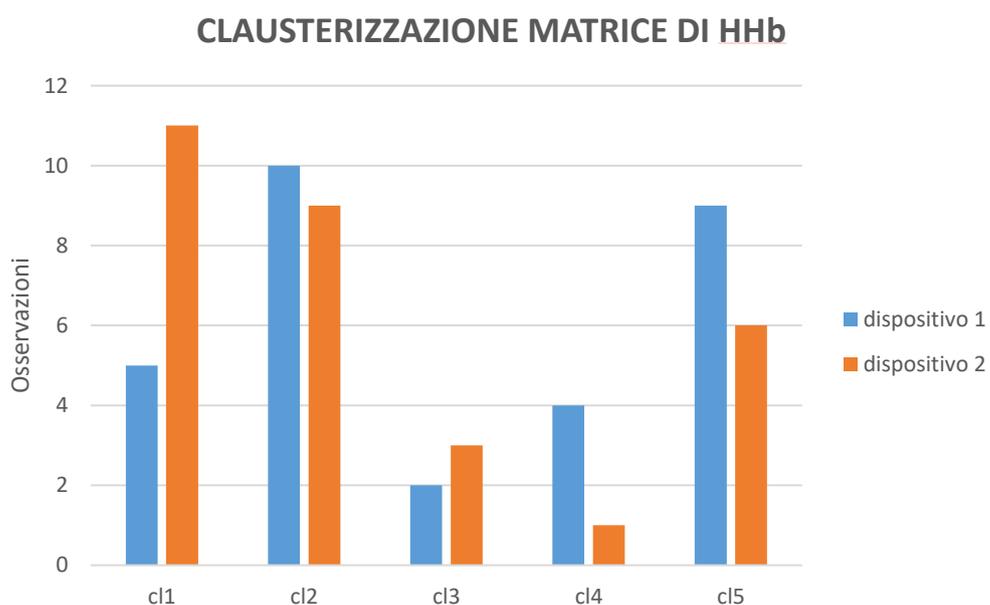


Figura 4.15 Istogramma indicante la clusterizzazione della matrice di HHb in 5 cluster. Distribuzione delle osservazioni appartenenti ai dispositivo 1 (in blu) e del dispositivo 2 (in arancione) nei cluster.

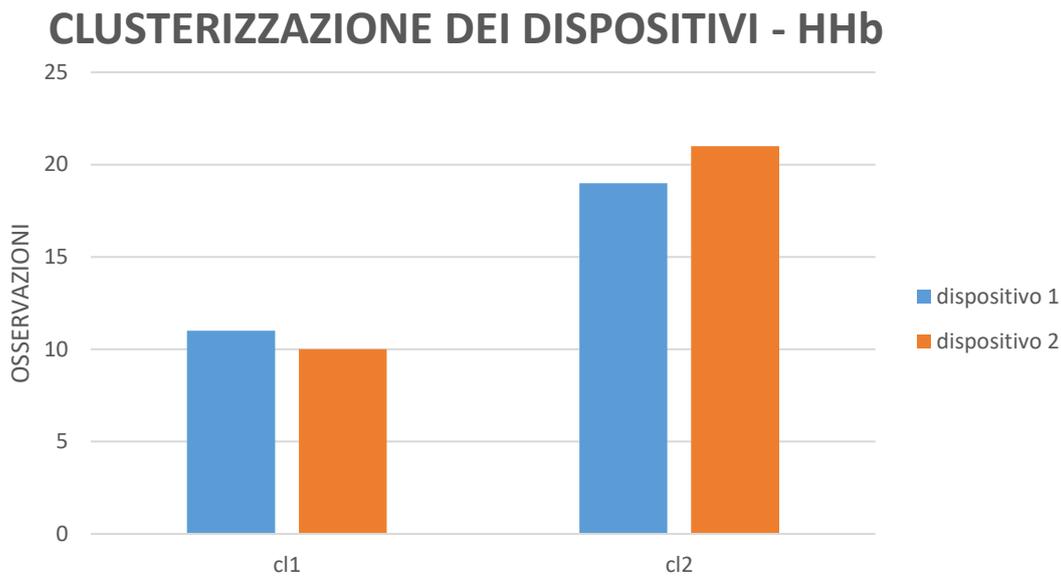


Figura 4.16 Istogramma indicante la clusterizzazione dei dispositivi delle osservazioni di HHb in 2 cluster. Distribuzione delle osservazioni appartenenti ai dispositivo 1 (in blu) e del dispositivo 2 (in arancione) nei cluster.

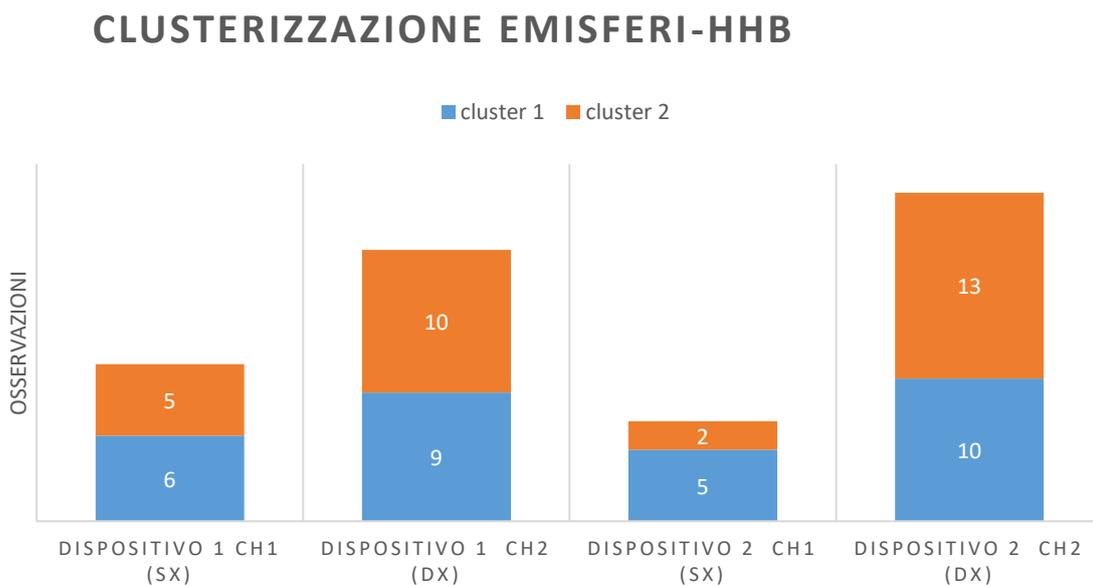


Figura 4.17 Istogramma indicante la clusterizzazione degli emisferi delle osservazioni di HHb in 2 cluster. Distribuzione degli emisferi sinistro (CH1) e destro (CH2) dei dispositivi all'interno dei due cluster.

4.5 Considerazioni finali metodo del confronto

I risultati ottenuti tramite algoritmo di k -means sono promettenti e quindi può essere utilizzato nella distinzione futura di due dispositivi NIRS differenti. Ci sono però alcune migliorie che possono essere effettuate. In prima battuta, risulterebbe sicuramente proficuo utilizzare i soggetti per la sperimentazione con il più simile background fisiologico, quindi

utilizzare tutti soggetti non fumatori. La scarsa risposta emodinamica dovuta dall'irrigidimento dei vasi sanguigni ottenuta dalle acquisizioni del soggetto 3 (fumatore) hanno reso di più difficile interpretazione i dati di emoglobina ossigenata in questo soggetto. L'emoglobina deossigenata invece, sembra non aver risentito degli effetti della condizione di fumatore, però lo scarso numero di osservazioni inerenti a soggetti fumatori non rende possibile alcun tipo di analisi. L'utilizzo quindi di un dataset ottenuto da un numero più elevato di soggetti sarebbe sicuramente più rilevante dal punto di vista statistico, così come la possibilità di estendere l'indagine clinica ad un numero elevato di soggetti. Il protocollo di acquisizione dei segnali, ha portato all'ottenimento con successo dei segnali di emoglobina ossigenata e deossigenata, quindi ne è suggerito l'utilizzo nel caso di successive acquisizioni tramite prototipo NIRS. Queste però non hanno incrementato però le prestazioni della classificazione, quindi potrebbe essere utile rilevare le migliori features che forniscano una classificazione più accurata. Inoltre essendo numerose le features estratte, si potrebbe pensare di effettuare una riduzione di dimensionalità dei dati tramite analisi delle componenti principali (PCA). L'analisi delle singole componenti di emoglobina ossigenata e deossigenata, ha inoltre dimostrato come l'algoritmo non clusterizzi in base alle differenze tra gli emisferi, dividendo quindi il dataset in cluster in cui non è possibile distinguere una differenza marcata tra i dispositivi.

Conclusioni

Lo stato dell'arte dei dispositivi NIRS ed in generale del suo utilizzo nel neuroimaging funzionale ci fa comprendere quali siano le difficoltà da superare al fine di ottenere risultati comparabili tra diversi dispositivi negli studi effettuati. La standardizzazione dei metodi sia di acquisizione dati tramite indagini cliniche o su fantocci sia di analisi ed estrapolazione di risultati da essi, comporterebbe un importante passo avanti nella comprensione dell'accoppiamento neuro-vascolare che nella confrontabilità e ripetibilità dei risultati ottenuti sia con dispositivi diversi, sia in centri di ricerca diversi. Come già discusso in precedenza, la definizione di un fantoccio condiviso e comune per la validazione dei dispositivi NIRS, permetterebbe di ridurre al minimo le differenze di calibrazione dello strumento tra una casa produttrice ed un'altra, soffermandosi quindi sugli aspetti fisiologici al fine di utilizzare questo tipo di dispositivo anche nella diagnostica. Un fantoccio con caratteristiche standardizzate permetterebbe un notevole incremento di interesse del settore verso questi dispositivi, perché più gruppi di ricerca e/o case produttrici, nuove a questi, svilupperebbero la loro idea di dispositivo NIRS generando concorrenza e crescita. Il metodo di analisi utilizzato, risulta quindi efficace nel non riuscire a distinguere i due dispositivi diversi, anche quando la matrice di input dell'algoritmo è formata dal singolo cromoforo. Le incertezze potranno anche essere corrette individuando se gli errori di classificazione dipendono dal dispositivo utilizzato o se sono errori dovuti alla variabile soggetto. La capacità del k -means nel distinguere il dataset nei due cluster corrispondenti ai cromofori potrebbe essere utilizzata anche per assicurare il corretto utilizzo e le corrette acquisizioni ottenute dal un dispositivo NIRS che si vuole validare. Lo step successivo a questo metodo di validazione, potrebbe essere l'incremento del numero dei cluster a 4 individuando i cluster non solo in base ai cromofori, ma anche in base ai due strumenti diversi utilizzati con l'obiettivo di calibrare il prototipo rendendolo pari al dispositivo in commercio.

Appendice

Protocollo di validazione strumento NIRS per confronto con NIRO-200NX

Introduzione: Lo scopo del documento è quello di effettuare la validazione dello strumento NIRS sviluppato in laboratorio tramite il confronto dei risultati ottenuti con il NIRO-200NX. Per effettuare la validazione sarà eseguito un task di apnea espiratoria (breath-holding) con entrambi gli strumenti NIRS a disposizione.

Sperimentatori: Valentina Agostini, Marco Knaflitz, Marco Ghislieri, Daniele Fortunato, Claudio Ambrosecchia.

Luogo dell'esperimento: Dipartimento di Elettronica e Telecomunicazioni del Politecnico di Torino,

Corso Castelfidardo 42° A, III piano.

Orario: al mattino dopo una colazione leggera.

Soggetti: 3 in stato di buona salute e non fumatori.

Misurazioni: Consumo metabolico cerebrale della *corteccia prefrontale destra* (PFC-Dx) e della *corteccia prefrontale sinistra* (PFC-Sx) in configurazione dual channel mediante NIRS durante "breath-holding".

Posizione ricevitori ed emettitori: posizionamento di emettitori e di ricevitore a 4 cm uno dall'altro fissati ad una altezza di 1 cm sopra l'arcata sopraccigliare tramite nastro biadesivo più una fascia elastica per garantire il mantenimento della posizione, comprendendo tra essi la posizione Fp1 per la PFC-Sx e Fp2 per la PFC-Dx del 10-20 Electrode Placement System.

Ripetizione delle misurazioni: Le misurazioni saranno effettuate con prototipo di strumento NIRS in alternanza con strumento NIRO-200NX.

Posizione del soggetto durante le misurazioni: seduta su di una sedia con altezza regolabile a seconda dell'altezza del soggetto, piedi appoggiati a terra con base allargata e stabile, schiena diritta e mani appoggiate sulla scrivania posta di fronte al soggetto. La posizione deve garantire la massima comodità al soggetto. Da verificare anche le condizioni di luminosità e rumorosità della stanza in cui si tengono le acquisizioni al fine di ridurre al minimo i disturbi.

Durata e procedura misurazioni:

- 2'. Istruzioni + posizionamento strumento NIRS su soggetto.
- 2'. Breath-holding task.
- Rest
- 2'. Posizionamento strumento NIRO-200NX su soggetto.
- 2'. Breath-holding task.
- Rest

Ciclo di registrazione:

Operazioni	<i>Istruzioni + posizionamento strumento NIRS su soggetto</i>	<i>breath- holding task</i>	<i>rest</i>	<i>Posizionamento Strumento NIRO-200NX su soggetto</i>	<i>breath- holding task</i>	<i>rest</i>
<i>Durata</i>	<i>2'</i>	<i>2'</i>		<i>2'</i>	<i>2'</i>	

Il ciclo di registrazione va ripetuto 5 volte per soggetto al fine di ottenere un adeguato numero di dati a disposizione, a meno che non si raggiunga prima dei 5 cicli l'adattamento della risposta emodinamica a stimolo.

Durata totale per soggetto: maggiore di 35' a seconda del soggetto.

Descrizione breath-holding Task: Il soggetto verrà sottoposto ad apnea espiratoria. Il soggetto respirerà normalmente per 10''. Effettuata l'ultima espirazione che non deve essere profonda, dovrà fermarsi in apnea. Se il soggetto ha necessità, può tappare il naso con la mano. Una volta avvertito lo sforzo e quindi la necessità di respirare, il soggetto potrà tornare a respirare regolarmente. Al fine di standardizzare le acquisizioni ed avere la durata dei task il meno variabile possibile, l'operatore annuncerà il tempo passato dall'inizio del Task a passi di 10''.

Contemporaneamente e per tutta la durata del test, verranno eseguite le misurazioni NIRS sulla PFC.

Ruolo dell'operatore: è suo il compito di posizionamento dei ricevitori ed emettitori degli strumenti NIRS. Dovrà assicurarsi che il valore di Tissue Oxygenation Index (TOI) ovvero l'indice di saturazione del tessuto sia maggiore del 70% e stabile; per ogni task effettuato dovrà porre i marker di inizio e fine task sul dispositivo appuntando il numero del marker su apposito documento "Scheda_NIRS_eventi_CA" il quale indica in ordine l'elenco dei marker posti durante le acquisizioni, in modo da facilitare l'elaborazione del segnale offline.

Dovrà inoltre istruire i soggetti riguardo le misurazioni e guidarli ad una corretta esecuzione dei task. Una volta posizionato il prototipo su soggetto e dopo aver effettuato il "breath-holding task" seguito da cambio di strumento di acquisizione, l'operatore dovrà accertarsi che il segnale acquisito sia quello corrispondente ad un corretto posizionamento dello strumento; in caso contrario sarà necessario riposizionare lo strumento e ripetere il task. Se il segnale acquisito è conforme ad un corretto posizionamento dello strumento, ottenendo durante il task un innalzamento della concentrazione di emoglobina ossigenata, in contemporanea ad una diminuzione dell'emoglobina deossigenata, si potrà procedere con il successivo ciclo di registrazione.

Scheda NIRS

Cognome _____

Nome

Data esame _____

Tipo esame

Apnea espiratoria

Lista Eventi

Ciclo 1

	<i>Inizio</i>	<i>Fine</i>
<i>Prototipo NIRS NIRO-200NX</i>		

Ciclo 2

	<i>Inizio</i>	<i>Fine</i>
<i>Prototipo NIRS NIRO-200NX</i>		

Ciclo 3

	<i>Inizio</i>	<i>Fine</i>
<i>Prototipo NIRS NIRO-200NX</i>		

Ciclo 4

	<i>Inizio</i>	<i>Fine</i>
<i>Prototipo NIRS NIRO-200NX</i>		

Ciclo 5

	<i>Inizio</i>	<i>Fine</i>
<i>Prototipo NIRS NIRO-200NX</i>		

Osservazioni

Compilato da: _____

Bibliografia

- [1] J. Andrew Taylor, C. O. Tan, and J. W. Hamner, “Assessing cerebral autoregulation via oscillatory lower body negative pressure and projection pursuit regression,” *J. Vis. Exp.*, no. 94, pp. 1–11, 2014, doi: 10.3791/51082.
- [2] H. McPhee, “Smooth muscle cells scheme,” 2020. <https://teachmephysiology.com/histology/tissue-structure/smooth-muscle/>.
- [3] G. Pfurtscheller, G. Bauernfeind, S. C. Wriessnegger, and C. Neuper, “Focal frontal (de)oxyhemoglobin responses during simple arithmetic,” *Int. J. Psychophysiol.*, vol. 76, no. 3, pp. 186–192, 2010, doi: 10.1016/j.ijpsycho.2010.03.013.
- [4] M. Abtahi, A. Amiri, D. Byrd, and K. Mankodiya, “Hand Motion Detection in fNIRS Neuroimaging Data,” *Healthcare*, vol. 5, no. 4, p. 20, 2017, doi: 10.3390/healthcare5020020.
- [5] F. Scholkmann *et al.*, “A review on continuous wave functional near-infrared spectroscopy and imaging instrumentation and methodology,” *Neuroimage*, vol. 85, pp. 6–27, 2014, doi: 10.1016/j.neuroimage.2013.05.004.
- [6] Z. Shoaib, M. Ahmad Kamran, M. M. N. Mannan, and M. Y. Jeong, “Approach to optimize 3-dimensional brain functional activation image with high resolution: a study on functional near-infrared spectroscopy,” *Biomed. Opt. Express*, vol. 10, no. 9, p. 4684, 2019, doi: 10.1364/boe.10.004684.
- [7] A. Farina *et al.*, “In-vivo multilaboratory investigation of the optical properties of the human head,” *Biomed. Opt. Express*, vol. 6, no. 7, p. 2609, 2015, doi: 10.1364/boe.6.002609.
- [8] F. Scholkmann *et al.*, “A review on continuous wave functional near-infrared spectroscopy and imaging instrumentation and methodology,” *Neuroimage*, vol. 85, pp. 6–27, 2014, doi: 10.1016/j.neuroimage.2013.05.004.
- [9] A. Valipour, A. D. McGown, H. Makker, C. O’Sullivan, and S. G. Spiro, “Some factors affecting cerebral tissue saturation during obstructive sleep apnoea,” *Eur. Respir. J.*, vol. 20, no. 2, 2002, doi: 10.1183/09031936.02.00265702.
- [10] A. Reviews, “Quick links to online content,” *October*, vol. 2, no. 1, pp. 1–19, 1989, doi: 10.1146/annurev.biochem.64.1.721.

- [11] M. Ferrari and V. Quaresima, “A brief review on the history of human functional near-infrared spectroscopy (fNIRS) development and fields of application,” *Neuroimage*, vol. 63, no. 2, pp. 921–935, 2012, doi: 10.1016/j.neuroimage.2012.03.049.
- [12] M. Ferrari, E. Zanette, I. Giannini, G. Sideri, C. Fieschi, and A. Carpi, “Effects of carotid artery compression test on regional cerebral blood volume, hemoglobin oxygen saturation and cytochrome-C-oxidase redox level in cerebrovascular patients.,” *Adv. Exp. Med. Biol.*, vol. 200, 1986, doi: 10.1007/978-1-4684-5188-7_28.
- [13] A. Villringer, J. Planck, S. Stodieck, K. Botzel, L. Schleinkofer, and U. Dirnagl, “Noninvasive assessment of cerebral hemodynamics and tissue oxygenation during activation of brain cell function in human adults using near infrared spectroscopy,” in *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 1994, vol. 345, doi: 10.1007/978-1-4615-2468-7_74.
- [14] A. Villringer, J. Planck, C. Hock, L. Schleinkofer, and U. Dirnagl, “Near infrared spectroscopy (NIRS): A new tool to study hemodynamic changes during activation of brain function in human adults,” *Neurosci. Lett.*, vol. 154, no. 1–2, 1993, doi: 10.1016/0304-3940(93)90181-J.
- [15] Y. Hoshi, “Functional near-infrared optical imaging: Utility and limitations in human brain mapping,” *Psychophysiology*, vol. 40, no. 4, 2003, doi: 10.1111/1469-8986.00053.
- [16] M. A. Franceschini, V. Toronov, M. E. Filiaci, E. Gratton, and S. Fantini, “On-line optical imaging of the human brain with 160-ms temporal resolution,” *Opt. Express*, vol. 6, no. 3, 2000, doi: 10.1364/oe.6.000049.
- [17] D. A. Boas and A. M. Dale, “Simulation study of magnetic resonance imaging-guided cortically constrained diffuse optical tomography of human brain function,” in *Applied Optics*, 2005, vol. 44, no. 10, doi: 10.1364/AO.44.001957.
- [18] M. Okamoto *et al.*, “Three-dimensional probabilistic anatomical cranio-cerebral correlation via the international 10-20 system oriented for transcranial functional brain mapping,” *Neuroimage*, vol. 21, no. 1, 2004, doi: 10.1016/j.neuroimage.2003.08.026.
- [19] Hamamatsu, “~~OBJ~~OBJ: A highly functional tissue oxygenation monitor to meet a variety of needs,” pp. 1–4, 2010, [Online]. Available: papers3://publication/uuid/A19B973A-B939-4CA2-A844-B9588C064D9D.

- [20] A. Hadad and A. Braidot, “VI Latin American congress on biomedical engineering CLAIB 2014, paran, Argentina 29, 30 & 31 october 2014,” *IFMBE Proc.*, vol. 49, no. October 2014, pp. 103–106, 2015, doi: 10.1007/978-3-319-13117-7.
- [21] L. M. L. Dix, F. Van Bel, W. Baerts, and P. M. A. Lemmers, “Comparing near-infrared spectroscopy devices and their sensors for monitoring regional cerebral oxygen saturation in the neonate,” *Pediatr. Res.*, vol. 74, no. 5, pp. 557–563, 2013, doi: 10.1038/pr.2013.133.
- [22] D. Han and H. Zhang, “Validation of EGOS-600 Near Infrared Spectroscopy to Measure Cerebral Oxygen Saturation by Comparing to NIRO-200nx In Vitro and In Vivo,” *J. Clin. Exp. Cardiol.*, vol. 07, no. 05, 2016, doi: 10.4172/2155-9880.1000440.
- [23] F. Franco and A. Di Napoli, “Agreement Between Quantitative Measurements: The Bland-Altman Method,” *G. di Tec. Nefrol. e Dial.*, vol. 29, no. 1, pp. 59–61, 2017, doi: 10.5301/gtnd.2017.16651.
- [24] S. Hyttel-Sorensen, S. Kleiser, M. Wolf, and G. Greisen, “Calibration of a prototype NIRS oximeter against two commercial devices on a blood-lipid phantom,” *Biomed. Opt. Express*, vol. 4, no. 9, p. 1662, 2013, doi: 10.1364/boe.4.001662.
- [25] S. Kleiser *et al.*, “Comparison of tissue oximeters on a liquid phantom with adjustable optical properties: an extension,” *Biomed. Opt. Express*, vol. 9, no. 1, p. 86, 2018, doi: 10.1364/boe.9.000086.
- [26] S. Susumu, T. Sumio, O. Takeo, and K. Yukio, “A Tissue oxygenation monitor using NIR spatially resolved spectroscopy,” *Proc. SPIE, Int. Soc. Opt. Eng.*, vol. 3597, no. January 1999, pp. 582–592, 199AD, [Online]. Available: http://proceedings.spiedigitallibrary.org/data/Conferences/SPIEP/49567/582_1.pdf.
- [27] J. Kraitl, U. Timm, and H. Ewald, “Non-invasive measurement of blood and tissue parameters based on VIS-NIR spectroscopy,” in *Optical Diagnostics and Sensing XIII: Toward Point-of-Care Diagnostics*, 2013, vol. 8591, doi: 10.1117/12.2001274.
- [28] A. M. De Grand *et al.*, “Tissue-like phantoms for near-infrared fluorescence imaging system assessment and the training of surgeons,” *J. Biomed. Opt.*, vol. 11, no. 1, 2006, doi: 10.1117/1.2170579.
- [29] G. C. Beck, N. Akgn, A. Rck, and R. Steiner, “Design and characterisation of a tissue

- phantom system for optical diagnostics,” *Lasers Med. Sci.*, vol. 13, no. 3, pp. 160–171, 1998, doi: 10.1007/s101030050070.
- [30] D. J. F. Cohen, “Scholarship @ Western Monte-Carlo Simulations of Near-infrared Light Propagation in the Adult Human Head,” 2019.
- [31] G. Quarto, A. Pifferi, I. Bargigia, A. Farina, R. Cubeddu, and P. Taroni, “Recipes to make organic phantoms for diffusive optical spectroscopy,” *Appl. Opt.*, vol. 52, no. 11, 2013, doi: 10.1364/AO.52.002494.
- [32] M. Izzetoglu, J. Du, K. Izzetoglu, H. Ayaz, B. Onaral, and B. Ben Dor, “Multilayer, Dynamic, Mixed Solid/Liquid Human Head Models for the Evaluation of near Infrared Spectroscopy Systems,” *IEEE Trans. Instrum. Meas.*, vol. 69, no. 10, pp. 8441–8451, 2020, doi: 10.1109/TIM.2020.2990261.
- [33] S. Suzuki, S. Takasaki, T. Ozaki, and Y. Kobayashi, “<title>Tissue oxygenation monitor using NIR spatially resolved spectroscopy</title>,” in *Optical Tomography and Spectroscopy of Tissue III*, 1999, vol. 3597, doi: 10.1117/12.356862.
- [34] Y. Zhang, X. Liu, Q. Wang, D. Liu, C. Yang, and J. Sun, “Influence of extracerebral layers on estimates of optical properties with continuous wave near infrared spectroscopy: analysis based on multi-layered brain tissue architecture and Monte Carlo simulation,” *Comput. Assist. Surg.*, vol. 24, no. sup1, pp. 144–150, 2019, doi: 10.1080/24699322.2018.1557902.
- [35] H. Isler, S. Kleiser, D. Ostojic, F. Scholkmann, T. Karen, and M. Wolf, “Liquid blood phantoms to validate NIRS oximeters: Yeast versus nitrogen for deoxygenation,” *Adv. Exp. Med. Biol.*, vol. 1072, pp. 381–385, 2018, doi: 10.1007/978-3-319-91287-5_61.
- [36] A. Dimofte, J. C. Finlay, and T. C. Zhu, “A method for determination of the absorption and scattering properties interstitially in turbid media,” *Phys. Med. Biol.*, vol. 50, no. 10, 2005, doi: 10.1088/0031-9155/50/10/008.
- [37] M. Johns, C. A. Giller, D. C. German, and H. Liu, “Determination of reduced scattering coefficient of biological tissue from a needle-like probe,” *Opt. Express*, vol. 13, no. 13, 2005, doi: 10.1364/opex.13.004828.
- [38] M. Wolf, G. Naulaers, F. Van Bel, S. Kleiser, and G. Greisen, “Review: A review of near infrared spectroscopy for term and preterm newborns,” *Journal of Near Infrared*

- Spectroscopy*, vol. 20, no. 1. 2012, doi: 10.1255/jnirs.972.
- [39] S. Kleiser, N. Nasser, B. Andresen, G. Greisen, and M. Wolf, “Comparison of tissue oximeters on a liquid phantom with adjustable optical properties,” *Biomed. Opt. Express*, vol. 7, no. 8, p. 2973, 2016, doi: 10.1364/boe.7.002973.
- [40] S. J. Arri, T. Muehlemann, M. Biallas, H. U. Bucher, and M. Wolf, “Precision of cerebral oxygenation and hemoglobin concentration measurements in neonates measured by near-infrared spectroscopy,” *J. Biomed. Opt.*, vol. 16, no. 4, 2011, doi: 10.1117/1.3570303.
- [41] F. Molinari, W. Liboni, G. Grippi, and E. Negri, “Relationship between oxygen supply and cerebral blood flow assessed by transcranial Doppler and near - Infrared spectroscopy in healthy subjects during breath - Holding,” *J. Neuroeng. Rehabil.*, vol. 3, pp. 1–13, 2006, doi: 10.1186/1743-0003-3-16.
- [42] R. Sepulveda, O. Montiel, G. Diaz, D. Gutierrez, and O. Castillo, “Classification of Encephalographic Signals using Artificial Neural Networks,” *Comput. y Sist.*, vol. 19, no. 1, 2015, doi: 10.13053/cys-19-1-1570.
- [43] T. Gateau, G. Durantin, F. Lancelot, S. Scannella, and F. Dehais, “Real-Time State estimation in a flight simulator using fNIRS,” *PLoS One*, vol. 10, no. 3, 2015, doi: 10.1371/journal.pone.0121279.
- [44] N. Naseer and K. S. Hong, “Classification of functional near-infrared spectroscopy signals corresponding to the right- and left-wrist motor imagery for development of a brain-computer interface,” *Neurosci. Lett.*, vol. 553, 2013, doi: 10.1016/j.neulet.2013.08.021.
- [45] J. Shin and J. Jeong, “Multiclass classification of hemodynamic responses for performance improvement of functional near-infrared spectroscopy-based brain-computer interface,” *J. Biomed. Opt.*, vol. 19, no. 6, 2014, doi: 10.1117/1.jbo.19.6.067009.
- [46] K. S. Hong and H. Santosa, “Decoding four different sound-categories in the auditory cortex using functional near-infrared spectroscopy,” *Hear. Res.*, vol. 333, 2016, doi: 10.1016/j.heares.2016.01.009.
- [47] Stanford, “k-means algorithm.”

<https://stanford.edu/~cpiech/cs221/handouts/kmeans.html>.

- [48] K. S. Hong, M. J. Khan, and M. J. Hong, “Feature Extraction and Classification Methods for Hybrid fNIRS-EEG Brain-Computer Interfaces,” *Front. Hum. Neurosci.*, vol. 12, no. June, pp. 1–25, 2018, doi: 10.3389/fnhum.2018.00246.