

Università degli studi di Verona

Dipartimento di informatica  
Corso di Laurea Triennale in Bioinformatica

Sviluppo di metodi per l'estrazione  
dei microstati cerebrali da EEG nella  
sclerosi multipla

Relatrice:  
Prof.ssa Storti Silvia Francesca

Correlatore:  
Paolini Edoardo

Candidata:  
**Demartis Giulia** VR443626

Anno accademico 2022/2023

Sommario

**Introduzione**..... 3

    Microstati cerebrali ..... 3

    I microstati nella sclerosi multipla..... 4

    Introduzione all’analisi dei microstati ..... 5

    Obiettivo..... 9

**Materiali e metodi** ..... 9

    Partecipanti e dati utilizzati ..... 9

    Tools ..... 10

    Estrazione dei microstati cerebrali da EEG..... 11

    Estrazione ed analisi dei microstati in sorgente..... 14

**Risultati** ..... 18

**Discussione**..... 21

**Conclusione** ..... 24

**Riferimenti**..... 25

# Introduzione

## Microstati cerebrali

Il cervello umano è sempre attivo. Anche in momenti in cui non si sta svolgendo alcun task, esso rimane in uno stato di attivazione in maniera organizzata tale da poter rispondere prontamente ad uno stimolo (Michel & Koenig, 2018). Questa nuova visione dello stato del cervello a riposo e su come esso processa le informazioni ha portato all'investigazione su larga scala dei Resting State Networks (RSNs) o network cerebrali a riposo. Gli RSNs sono regioni del cervello fisicamente separate che in una condizione di riposo comunicano tra loro e mostrano una forte connessione funzionale, ovvero una dipendenza temporale di attivazione neurale (Van den Heuvel & Hulshoff Pol, 2010). Questi network cerebrali si riorganizzano nel range del millisecondo per essere pronti a rispondere ad input diversi. Rivelare la dinamica spaziale e temporale dei RSNs permette di approfondire la dinamica cerebrale a riposo e come essi siano correlati a malattie cognitive e neurologiche. (Michel & Koenig, 2018)

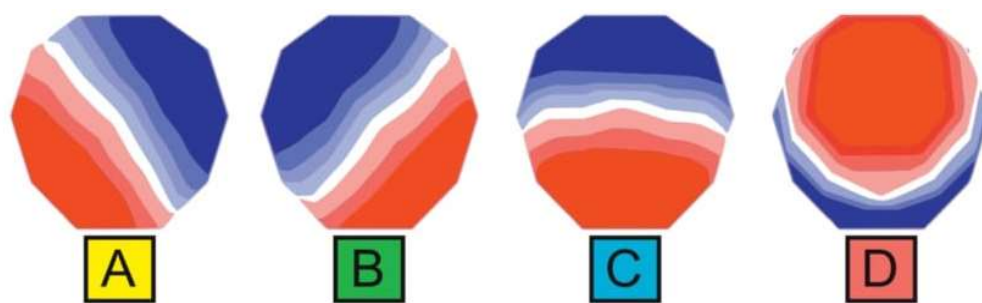
La Risonanza Magnetica funzionale (fMRI), si è rivelata troppo lenta per cogliere al meglio le transizioni di stato nel range del millisecondo a causa della sua risoluzione temporale limitata. Al contrario, metodologie come elettroencefalografia (EEG) e magnetoencefalografia (MEG), che hanno una risoluzione temporale molto elevata, riescono a catturarle al meglio e a relazionarle alle funzioni cognitive; per questo, si rivelano più adeguate all'indagine della dinamica temporale degli stati a riposo. Un approccio che ha preso piede negli ultimi anni è quello basato sul concetto di microstati cerebrali da EEG riportati per la prima volta da Lehmann et al. nel 1987 (Lehman et al., 1987; Michel & Koenig, 2018; Tait & Zhang, 2022; Tomescu et al., 2018).

I microstati cerebrali sono definiti come un periodo di tempo che varia dagli 80 ai 120 ms in cui una determinata mappa topografica, ossia una rappresentazione nello spazio del potenziale elettrico rilevato sullo scalpo, rimane quasi stabile (Michel & Koenig, 2018).

Questi periodi di stabilità del potenziale elettrico indicano un ampio coordinamento neuronale globale e un cambiamento di quest'ultimo rivela un cambiamento nel network attivo sottostante. L'analisi dei microstati cerebrali considera i segnali di tutti gli elettrodi contemporaneamente per creare una rappresentazione globale dello stato funzionale (Khanna et al., 2015).

L'EEG a riposo, considerabile come una serie di topografie del potenziale elettrico che evolvono nel tempo (Baldini et al., 2023), può essere descritto con un numero limitato di mappe topografiche in cui ogni mappa rimane stabile per un breve periodo temporale prima di cambiare rapidamente in una diversa mappa (Baldini et al., 2023; Khanna et al., 2015; Michel & Koenig, 2018).

Nella letteratura sono state identificate quattro mappe definite canoniche e denominate A, B, C, D (Khanna et al., 2015; Michel & Koenig, 2018).



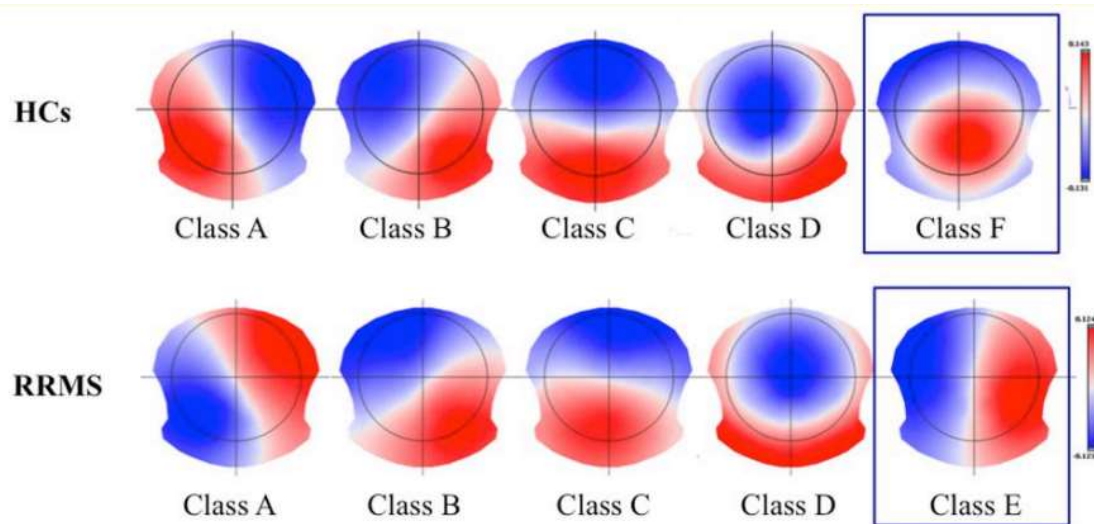
*Fig. 1: Le quattro mappe canoniche (Khanna et al., 2015)*

È stato dimostrato che i microstati sono uno strumento utile allo studio di malattie neurologiche come la schizofrenia, la demenza, l'epilessia, la sclerosi multipla, dove essi si presentano con dinamiche temporali diverse rispetto ai soggetti sani (Liu et al, 2021). Infatti, la durata, l'aspetto e la sequenza con cui si presentano sono fortemente influenzate da diversi stati mentali, ma sono necessari ulteriori studi per assegnare correttamente il ruolo funzionale di ciascuno dei microstati (Tomescu et al., 2018).

## I microstati nella sclerosi multipla

La sclerosi multipla è una malattia cronica e degenerativa del sistema nervoso centrale che provoca inizialmente la demielinizzazione causata da delle placche e in una fase più avanzata anche la perdita assonale che causa compromissione neurologica non traumatica (Dighriri et al., 2023). Pazienti con sclerosi multipla mostrano dei cambiamenti nella dinamica dei RSNs e nella connettività funzionale che possono essere indagati tramite l'analisi dei microstati (Baldini et al., 2023). L'analisi dei microstati condotta nello studio di Baldini et al. (2023) su soggetti affetti da sclerosi multipla rispetto a soggetti sani ha evidenziato differenze nella dinamica di tutti i microstati ad eccezione del microstato C.

Sono stati trovati, in entrambi soggetti sani e malati, i quattro microstati canonici A, B, C, D e un quinto microstato denominato F prevalente nei soggetti sani ed E prevalente nei soggetti malati (Fig. 2).



*Fig. 2: Risultati presentati nell'articolo di Baldini et al. (2023) che mostrano le mappe delle classi di microstati per soggetti sani HCs e per soggetti affetti da Sclerosi multipla RRMS. Viene evidenziata la presenza delle mappe E ed F.*

Va comunque tenuto in considerazione che essendo analisi statistiche condotte su un gruppo di persone, sul singolo soggetto potrebbe non essere presente in maniera preponderante la mappa E tipica di un soggetto affetto, o la mappa F tipica di un soggetto sano.

Inoltre, nonostante questo studio presenti diversi vantaggi essendo non invasivo e poco dispendioso, il limite principale è la limitata capacità di rilevare le attività delle strutture cerebrali profonde, le quale potrebbero dare un'informazione più accurata circa gli stati cerebrali in sclerosi multipla.

## Introduzione all'analisi dei microstati

Nell'analisi dei microstati ogni mappa topografica corrispondente al picco della Global Field Power (GFP) viene considerata come uno stato discreto dell'EEG (Khanna et al, 2015).

La Global Field Power è descritta dalla seguente formula:

$$GFP(t) = \sqrt{\frac{1}{N} \sum_{i=1}^N (x_i(t) - \bar{x}(t))^2}$$

Con

- $GFP(t)$ : Global Field Power al tempo  $t$
- $N$ : numero di elettrodi
- $x_i(t)$ : potenziale elettrico registrato dall'elettrodo  $i$  al tempo  $t$
- $\bar{x}(t)$ : media delle ampiezze registrate da tutti gli elettrodi  $N$  al tempo  $t$

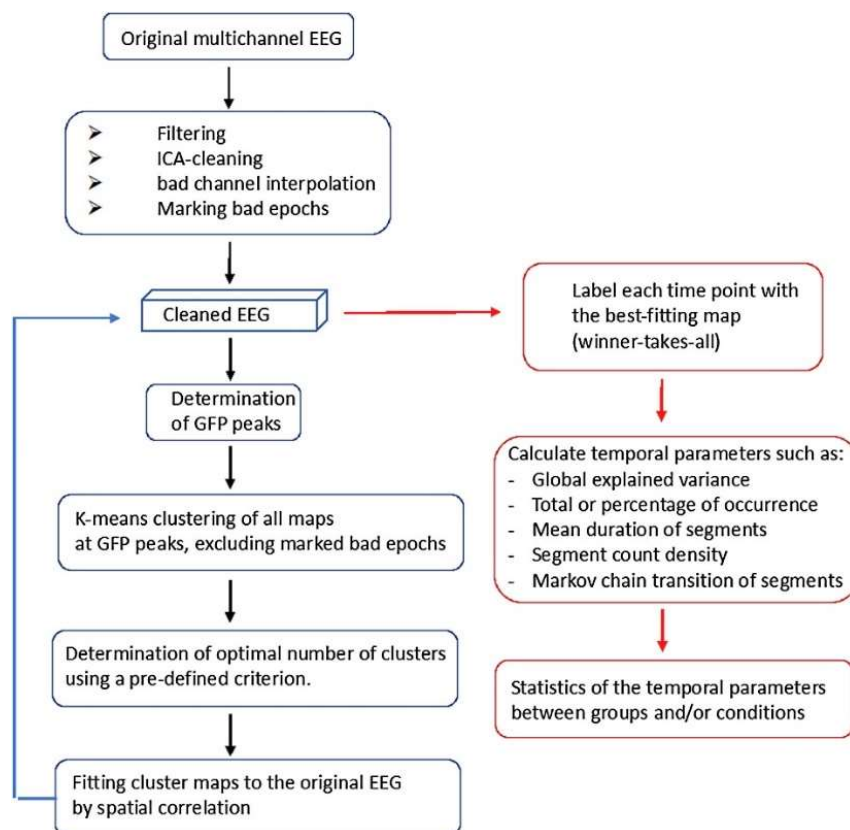
Essa rappresenta la varianza delle ampiezze delle attività elettriche misurate da tutti gli elettrodi  $N$  in un dato istante di tempo  $t$ . (Khanna et al., 2015).

Ogni picco della GFP indica un momento di massima sincronizzazione dell'attività neuronale e nell'analisi dei microstati cerebrali questi massimi locali sono considerati degli stati discreti rappresentabili con una mappa topografica di interesse (Khanna et al., 2015).

Le mappe corrispondenti ai picchi della GFP vengono estratte e sottoposte ad un algoritmo di clustering spaziale, come ad esempio il k-means, che consente di raggrupparle tutte in un numero limitato di gruppi basati sulla similarità topografica. Ogni gruppo è quindi rappresentato da una mappa topografica specifica.

Successivamente viene effettuato il backfitting delle mappe trovate sull'intero tracciato EEG: viene calcolata la correlazione spaziale tra la mappa rappresentativa del cluster e la mappa corrispondente ad ogni punto temporale del tracciato e ognuno di essi viene etichettato sulla base della correlazione più alta (Michel & Koenig, 2018).

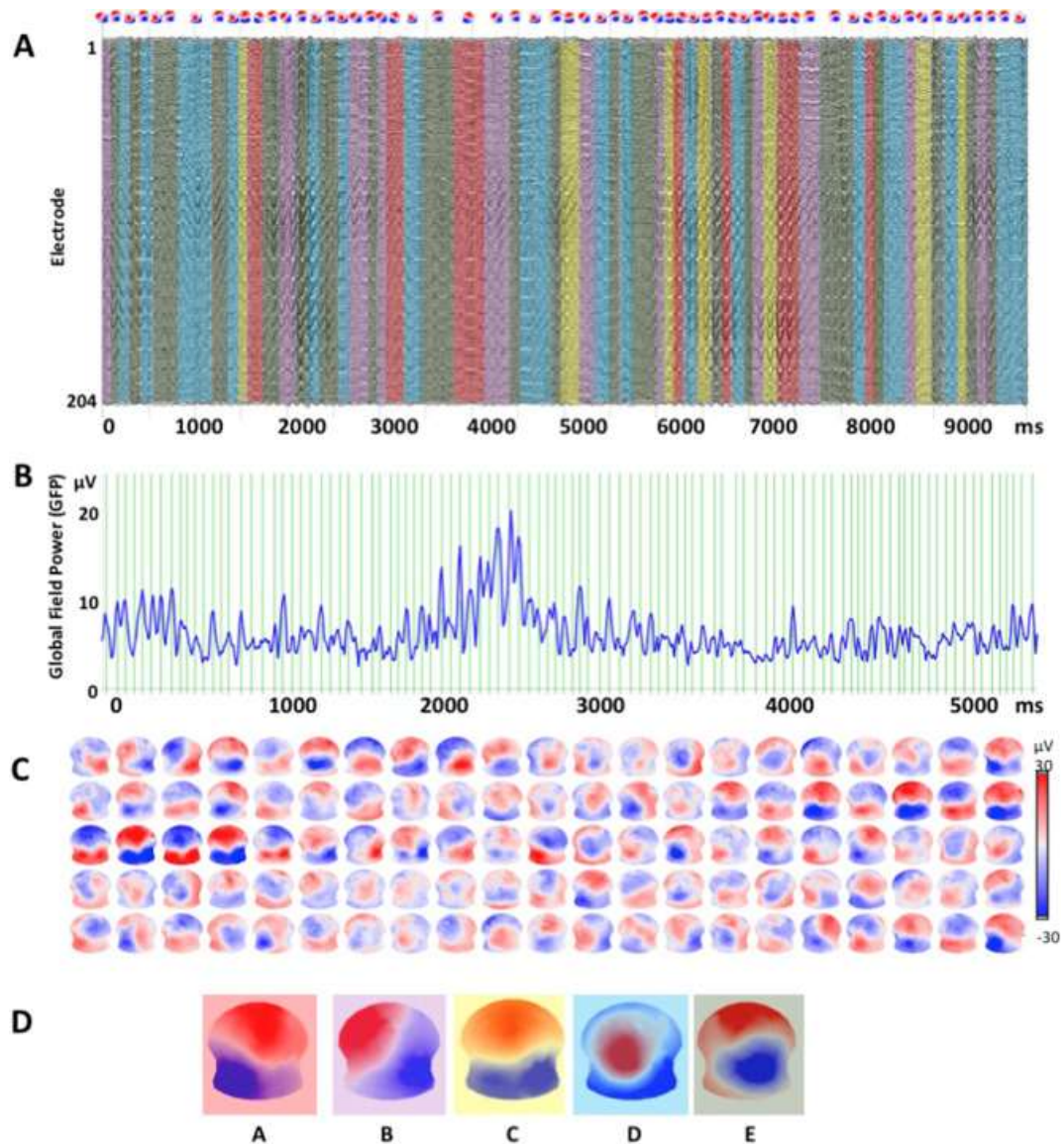
La Fig. 3 rappresenta in modo schematico la procedura.



*Fig. 3: pipeline per l'analisi e l'estrazione dei microstati. (Michel & Koenig, 2018.)*

I microstati vengono definiti solo successivamente al processo di backfitting.

In Fig. 4, ogni microstato è rappresentato sul tracciato EEG originale da un colore differente.

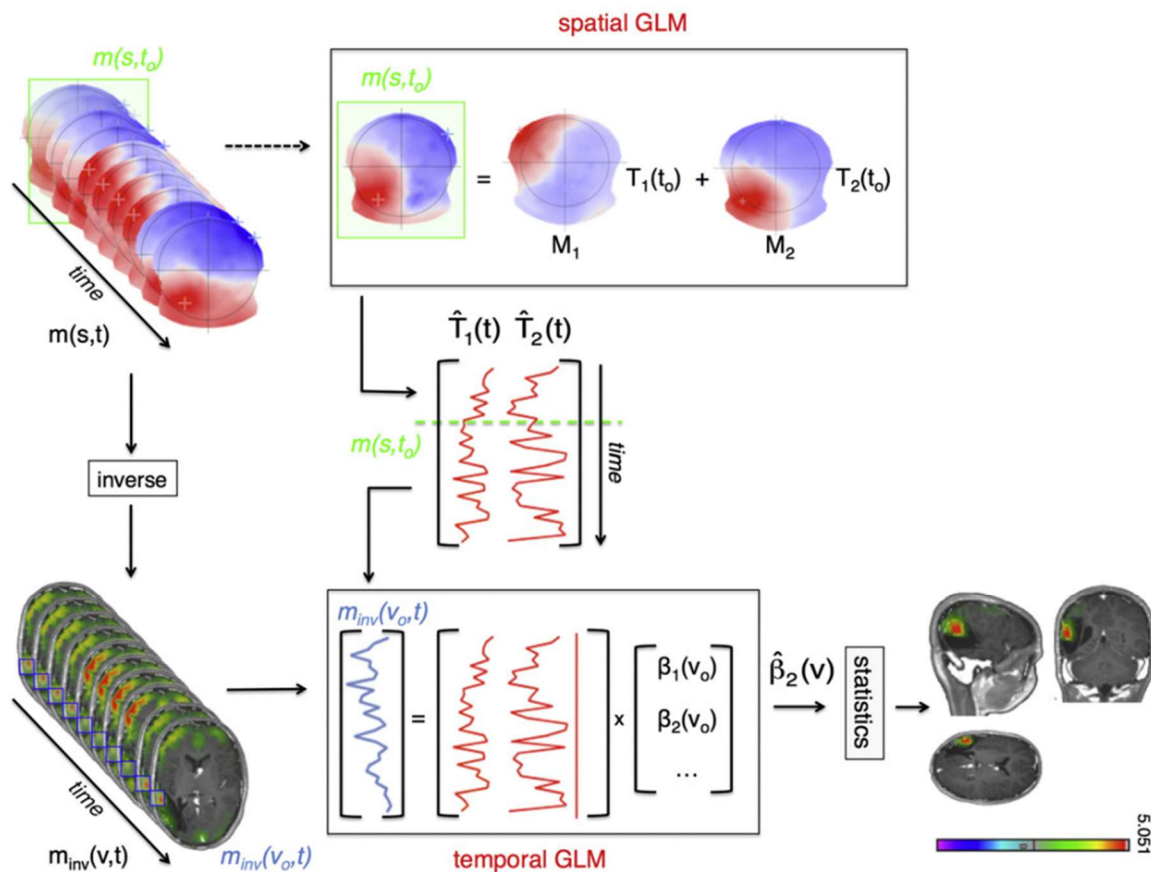


**Fig. 4:** Rappresentazione visiva del processo di estrazione e backfitting dei microstati cerebrali da EEG. **A.** Tracciato EEG di un soggetto a riposo. **B.** Curva GFP con riconoscimento dei picchi. **C.** Mappe topografiche corrispondenti a ciascun picco della curva GFP **D.** Classi delle mappe topografiche ottenute dopo il processo di clustering con k-means, queste mappe vengono poi sovrapposte al tracciato EEG in A ed ogni punto temporale viene etichettato con la mappa con la quale c'è maggiore similarità. Sono presenti colori diversi ad indicare microstati diversi. (Michel & Koenig, 2018.)

Alcuni studi hanno tentato di trovare la sorgente che genera un determinato microstato combinando l'analisi spaziale dei microstati con una successiva ricostruzione della sorgente. Custo et al. (2017) hanno proposto la metodologia TESS (Topographic Electrophysiological State Source-imaging) ispirata alla fMRI e alla risposta BOLD (Blood Oxygenation Level Dependent) agli stimoli.



La chiave di questa metodologia è la definizione di una Design Matrix, formata dalle classi principali delle mappe dei picchi della GFP, ottenute usando metodi di clustering come il K-means. Queste mappe vengono utilizzate come regressori per una prima GLM (General Linear Model, un approccio statistico di regressione lineare), in modo da stimarne l'andamento temporale. In modo parallelo, viene applicata l'inverse solution per ogni punto temporale dell'EEG per passare dallo spazio dei sensori allo spazio delle sorgenti. Successivamente, l'andamento temporale stimato viene utilizzato a sua volta come regressore in una seconda GLM per stimare dei coefficienti  $\beta$  che forniscono la locazione e l'ampiezza delle sorgenti che generano le topografie. Per approfondimenti sulla metodologia TESS consultare Custo et al. (2014, 2017). La pipeline appena descritta è presentata in Fig. 5.



**Fig. 5:** pipeline dell'algoritmo TESS (Topographic Electrophysiological State Source-imaging), ideato da Custo et al. (2014).

Nonostante l'algoritmo fornisca un approccio interessante verso lo studio dei microstati, si è scelto di non seguire la metodologia TESS in quanto lo stesso gruppo di ricerca che lo ha sviluppato ha deciso di adottare algoritmi differenti che fornissero risultati più stabili e più compatibili con l'approccio di winner-takes-all relativo all'analisi dei microstati. La nostra scelta è pertanto ricaduta sulla pipeline presentata nell'articolo di



Tait & Zhang (2022) dove inizialmente viene calcolata la soluzione inversa dell'intero tracciato e successivamente viene effettuato un clustering delle dinamiche di sorgente. Dobbiamo precisare che la pipeline è stata presentata per dati MEG ma è applicabile anche a dati EEG nonostante le criticità che essi comportano, tra cui il problema della non unicità del problema inverso.

## Obiettivo

L'obiettivo del nostro studio è quello di indagare i microstati cerebrali sia sullo scalpo che in sorgente nel contesto della sclerosi multipla.

Per l'analisi sullo scalpo si intende seguire la pipeline presentata per la prima volta da Pascual-Marqui et al. (1995), che considera le mappe topografiche e si basa su un'analisi di Cluster K-mean che raggruppa tali mappe a seconda della loro correlazione spaziale, in modo da determinare la topografia maggiormente rappresentativa della varianza in ciascun cluster (Michel and Koenig, 2018).

Per quanto riguarda l'analisi in sorgente, invece, si procede attraverso l'uso della Soluzione Inversa seguendo la pipeline presentata nell'articolo di Tait & Zhang (2022).

Un ulteriore obiettivo del nostro studio è quello di indagare il tool presentato da Tait & Zhang (2022), sviluppato per lo studio e l'estrazione dei microstati e metterne a confronto i risultati con il più noto Cartool ([cartoolcommunity.unige.ch](http://cartoolcommunity.unige.ch)).

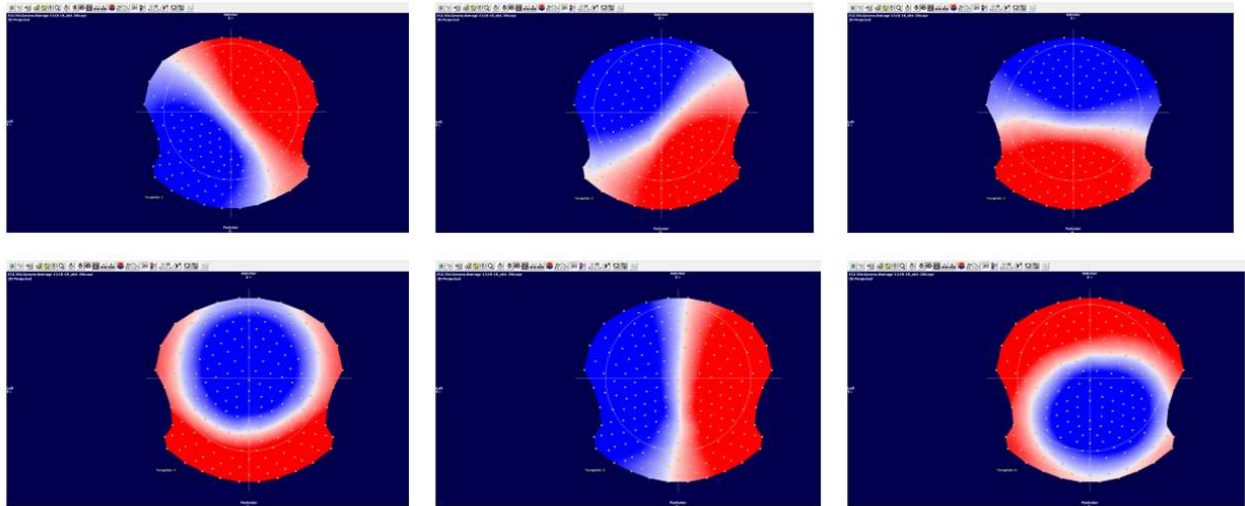
## Materiali e metodi

### Partecipanti e dati utilizzati

Tutte le indagini svolte sono state eseguite su dati forniti dall'Università di Trieste, precedentemente analizzati attraverso l'utilizzo di Cartool.

Le mappe topografiche delle classi di microstati sono visualizzabili in Fig. 6.

Si tratta di un tracciato EEG di un soggetto patologico. Il soggetto è stato sottoposto ad EEG ad alta densità a 256 canali in una condizione a riposo, seduto, e ad occhi chiusi. Il tracciato è stato successivamente pre-processato, mantenendo solo 204 canali per ulteriori indagini. La frequenza di campionamento è 500Hz ed è stato applicato un filtraggio passa banda tra 1-40 Hz. Infine, è stata applicata la ICA (Independent Component Analysis) per rimuovere gli artefatti presenti nel tracciato ed il dato è stato referenziato secondo la referenza media. (Baldini et al., 2023).



**Fig. 6:** Mappe topografiche corrispondenti alle 6 classi di microstati ottenute tramite analisi con Cartool. (Baldini et al., 2023.)

## Tools

### EEGLAB

*EEGLAB* è un toolbox interattivo di Matlab per processare EEG, MEG e altri dati elettrofisiologici continui o evento-relativi. Questo toolbox include Independent Component Analysis (ICA), analisi tempo/frequenza, rigetto degli artefatti, statistica evento-relativa e molti altri metodi utili per la visualizzazione di dati. Per ulteriori informazioni e tutorial fare riferimento a (<https://sccn.ucsd.edu/eeglab/index.php>).

### FieldTrip

*FieldTrip* è un toolbox per MATLAB che consente l'analisi di dati MEG, EEG e iEEG. È un software open source ed è stato sviluppato da membri e collaboratori dell'istituto Donders dell'università Radboud nei Paesi Bassi. Per ulteriori informazioni e tutorial fare riferimento a (<https://www.fieldtriptoolbox.org/>).

### +microstate

*+microstate* è un toolbox MATLAB per l'analisi dei microstati cerebrali e per la visualizzazione, che può essere eseguita sia a livello individuale sia a livello di gruppo. È stato sviluppato da Luke Tait e Jiaxiang Zhang nel 2022. Per accedere alla documentazione del toolbox fare riferimento a (<https://github.com/plus-microstate/plus-microstate.github.io>).

+microstate e FieldTrip si integrano tra loro per facilitarne l'accessibilità e FieldTrip si interfaccia con EEGLAB.

## Cartool

Cartool è un software sviluppato da Denis Brunet ([cartoolcommunity.unige.ch](http://cartoolcommunity.unige.ch)) che fornisce funzionalità di analisi di EEG e di estrazione dei microstati cerebrali tramite delle finestre di dialogo in cui inserire i dati ed effettuare scelte prestabilite. Nel software è inclusa una guida per l'utente che fornisce riferimenti alla letteratura specifica e spiegazioni sulle funzionalità stesse.

(<https://sites.google.com/site/cartoolcommunity/home?authuser=0>).

## Estrazione dei microstati cerebrali da EEG

Lo scopo di questa analisi è quello di indagare la dinamica temporale dei microstati estraendoli dall'EEG e raggruppandoli nelle principali classi.

Adattando successivamente queste mappe al campione EEG, e quindi etichettando ogni punto temporale con un microstato sulla base della somiglianza con le diverse mappe, è possibile leggere quest'ultimo come una sequenza di microstati.

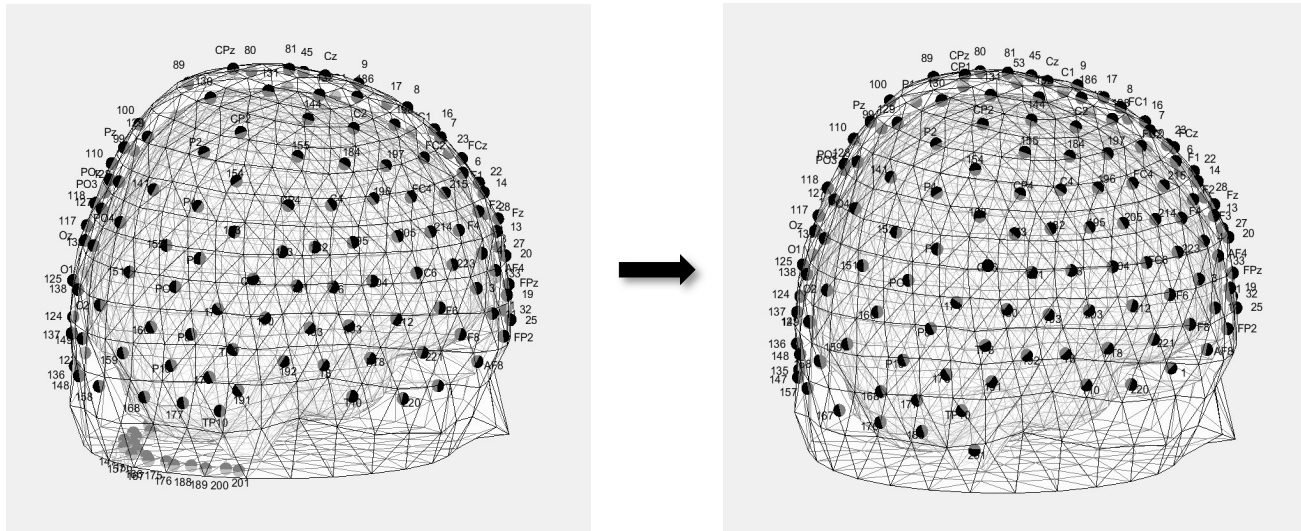
## Caricamento dei dati

È stato inizialmente caricato il dato su EEGLAB attraverso la funzione `pop_loadbv()`; e i corrispettivi elettrodi utilizzando `readlocs()`;

Successivamente, sono state rimosse tutte quelle parti del tracciato segnalate come 'Bad', ritagliando il dato.

0	0	"New Segment"
10239	10751	"bad"
22656	23018	"bad"
23426	23763	"bad"
115271	116485	"bad"

Altri dieci elettrodi sono stati rimossi dall'elenco perché non aderenti allo scalpo; il processo di interpolazione automatico, infatti, li proietta sulla base dell'headmodel, come è possibile notare dalla Fig. 7; mantenere elettrodi non aderenti allo scalpo per effettuare le analisi comporterebbe un errore nel risultato.



*Fig.7: Rimozione degli elettrodi non aderenti al modello di testa*

Questo è stato poi convertito in FieldTrip attraverso la seguente funzione:

```
eegData = eeglab2fieldtrip(EEG, 'preprocessing', 'none');
```

e successivamente in +microstate dove tutti i dati del soggetto vengono inseriti in un oggetto della classe Individual, la quale contiene metodi che permettono di importare, preelaborare i dati ed eseguire l'analisi dei microstati a livello individuale.

```
ms_scalp = microstate.individual();
```

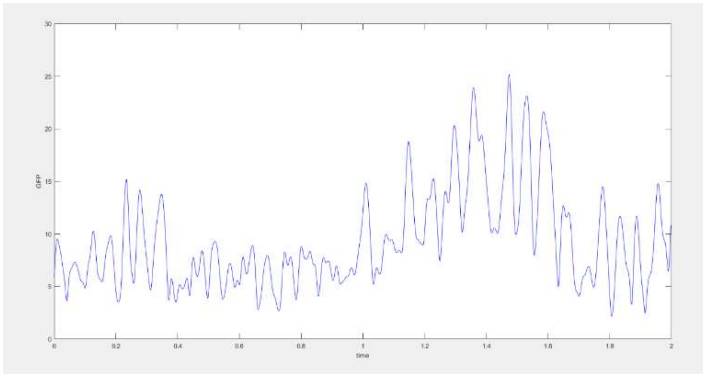
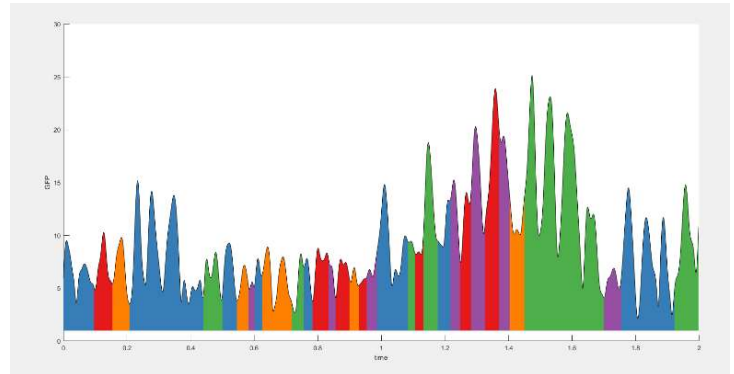
```
ms_scalp = ms_scalp.import_fieldtrip(eegData);
```

## Stima delle mappe topografiche

Si è proseguito con l'estrazione dei microstati dal soggetto, stimando 5 mappe topografiche (facendo riferimento allo studio Baldini et al., 2023).

```
ms_scalp = ms_scalp.cluster_estimatemaps(5);
```

Questa funzione applica l'algoritmo di clustering scelto (k-means di default) alle mappe topografiche corrispondenti ai picchi della GFP anch'essa calcolata nella funzione. Vengono pertanto stimate le mappe principali infine effettuato il backfitting sul dato di partenza.

**A.****B.**

**Fig. 8:** **A.** Curva GFP del tracciato EEG. **B.** Backfitting delle mappe topografiche sulla curva GFP.

Al termine dell'esecuzione della funzione, nell'oggetto individual, i campi *maps* e *label* che precedentemente erano vuoti, saranno riempiti con il risultato della funzione stessa.

*Maps* contiene per ogni elettrodo, per ogni mappa topografica, il potenziale elettrico corrispondente. *Label* invece, per ogni punto temporale, contiene l'etichetta corrispondente alla classe del microstato a cui esso viene assegnato andando a costruire così una serie temporale discreta di microstati.

Nell'eventualità che desiderassimo non porre il vincolo del numero di microstati, essendo *k* un parametro libero, è possibile anche calcolare il valore *k* ottimo per eseguire l'algoritmo, attraverso la seguente funzione:

```
k = ms_scalp.cluster_koptimum();
```

## Creazione del Layout

Successivamente è stato creato il Layout. Esso rappresenta la disposizione nello spazio 2D degli elettrodi che inizialmente erano invece distribuiti nello spazio tridimensionale. Questo processo di trasposizione viene eseguito sia attraverso +Microstate, utilizzando la funzione `microstate.functions.layout_creator()`, sia attraverso FieldTrip con la funzione `ft_prepare_layout()`.

In +microstate la funzione richiede in input il template, ossia le coordinate degli elettrodi, e le labels, ossia il nome associato ad ognuno di essi. Il template 'egi204' è stato creato appositamente da noi in quanto non presente un altro standard che si adattasse al numero e alla disposizione degli elettrodi utilizzata per la registrazione dell'EEG. Dopo diverse prove però si è optato per l'utilizzo del Layout ottenuto con Fieldtrip; esso, infatti, ci permette di avere un Outline

che segue il contorno degli elettrodi specificando `cfg.outline = 'convex'`; per ottenere una visualizzazione più corretta.

## Plot delle mappe topografiche risultanti

Infine, si procede con il plot delle mappe topografiche ottenute attraverso la funzione `individual.plot('maps', layout)`; è necessario specificare il layout creato per ottenere una topografia, senza specificarlo invece, si otterrebbe una matrice.

## Estrazione ed analisi dei microstati in sorgente

Questo processo di segmentazione in sorgente è basato sulla pipeline per la segmentazione sullo scalpo da EEG che utilizza il k-means ed è stata presentata nel paper di (Tait & Zhang, 2022). Il primo passo consiste nella ricostruzione in sorgente dei dati EEG forniti, utilizzando eLORETA (exact Low Resolution Brain Electromagnetic Tomography), algoritmo presentato da (Pascual-Marqui, 2007; 2009). È stato scelto eLORETA in quanto non è solo un metodo di imaging lineare ma un algoritmo di inverse solution con “zero error localization” in presenza di rumore nelle rilevazioni (Pascual-Marqui, 2007). È necessario ridurre la dimensionalità del dato ottenuto tramite la parcellizzazione dei corsi temporali in sorgente in regioni di interesse (ROIs). Di questi dati, solo quelli corrispondenti ai picchi della GFP verranno usati per ulteriori analisi. La GFP in sorgente differisce dalla GFP sullo scalpo; essa è definita come il vettore norma del segnale attraverso le regioni di interesse; in altri termini è la deviazione da una regione di spazio specifica in cui la densità di corrente in sorgente risulta essere zero (“zero current source density”), equivalente alla deviazione standard in caso di media zero. Successivamente vengono sottoposte le mappe corrispondenti ai picchi della GFP al k-means, individuando così le k classi di microstati (Tait & Zhang, 2022).

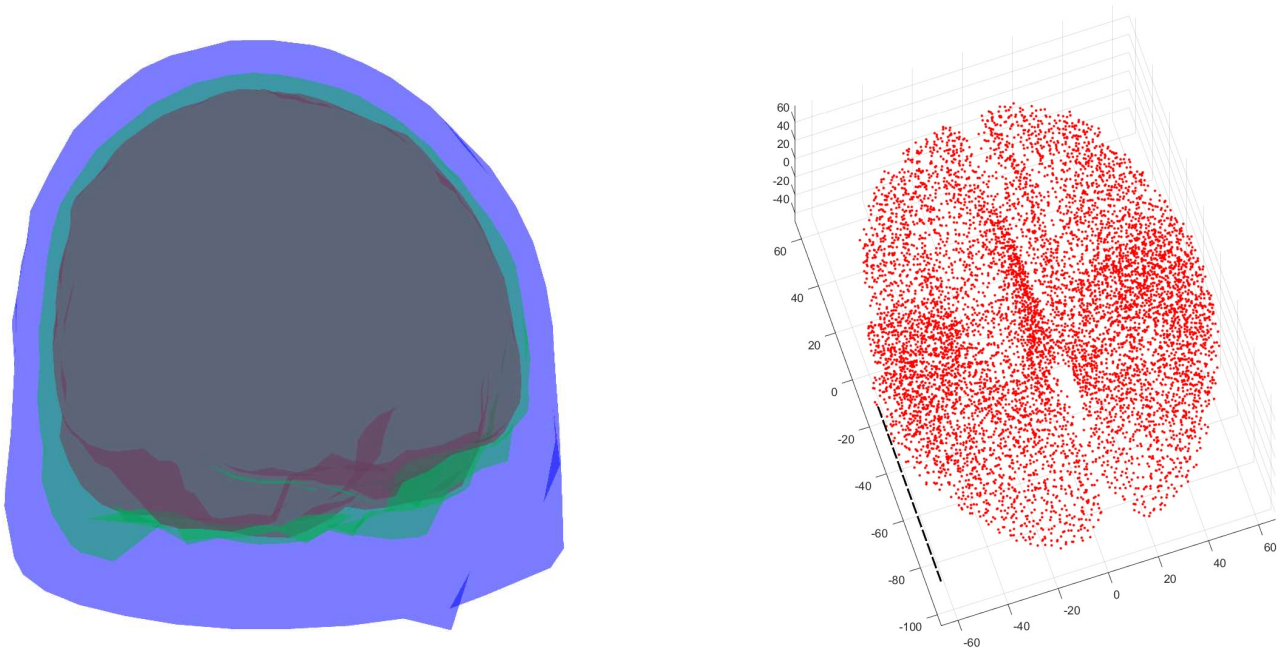
## Caricamento dei dati

Come prima cosa è stato caricato il dato in MATLAB tramite un'estensione di EEGLAB con la funzione `pop_loadbv()`; le parti del tracciato contrassegnate come “bad” sono state rimosse e il dato è stato convertito in formato Fieldtrip nel seguente modo:

```
eeg_data = eeglab2fieldtrip(EEG, 'preprocessing');
```

Per procedere al calcolo della soluzione inversa sono stati caricati il modello di testa “*Headmodel BEM*” che descrive come le correnti elettriche scorrano attraverso i tessuti; in generale il Boundary

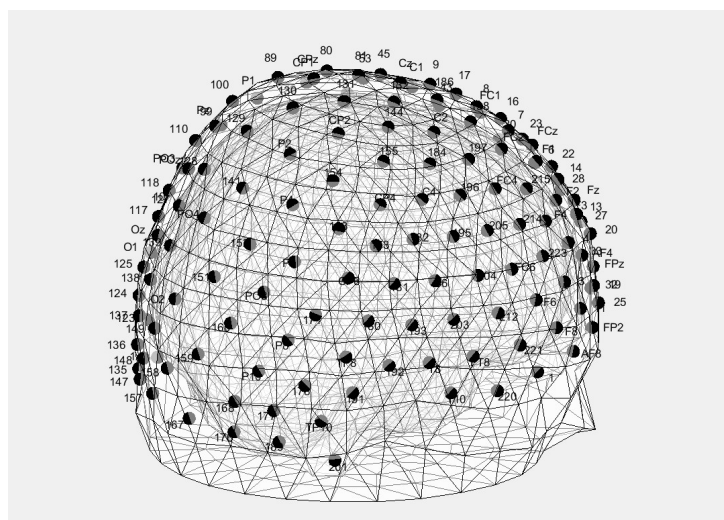
Element Method (BEM) o Headmodel consiste in una descrizione della geometria dei tessuti, in una descrizione della conduttività dei tessuti e in parametri matematici che ne derivano da essi (Fieldtrip). Si carica anche il modello dei punti soluzione denominato “*cortex\_8196.surf.gii*”, entrambi messi a disposizione da Fieldtrip.



*Fig. 9: Headmodel BEM e Punti soluzione*

## Riallineamento elettrodi e calcolo della Lead Field Matrix

Il passo sopra descritto è necessario al calcolo della Lead Field Matrix che verrà calcolata in seguito al riallineamento degli elettrodi sul modello di testa scelto.



*Fig. 10: Riallineamento degli elettrodi sul modello di testa*



La Lead Field Matrix si ottiene con `ft_prepare_leadfield(cfg)`; dove `cfg` è la matrice di configurazione di Fieldtrip dove i vari parametri, che si vogliono specificare per il calcolo, vengono inseriti.

## Soluzione Inversa

Una volta ottenuta la matrice per il modello diretto si può procedere al calcolo della soluzione inversa, utilizzando l'algoritmo di eLORETA (exact Low Resolution Brain Electromagnetic Tomography) implementato in Fieldtrip. Il codice necessario a ottenere i dati in sorgente è il seguente:

```
cfg = [];  
cfg.method = 'eloreta';  
cfg.sourcemodel = leadfield;  
cfg.headmodel = headmodel;  
cfg.eloreta.lambda = 0.05;  
cfg.eloreta.keepmom = 'yes';  
cfg.eloreta.keepfilter = 'yes';  
eeg_source = ft_sourceanalysis(cfg, eeg_data);
```

dove `eeg_data` è il dato caricato su cui è stata poi applicata la funzione `ft_timelockanalysis(cfg, eeg_data)`. Questa funzione non sarebbe necessaria in quanto il nostro dato presenta un solo trial ma viene applicata ugualmente per disporre il dato nella forma necessaria a procedere con le analisi successive.

Il campo denominato '*mom*' contiene il corso temporale delle densità di corrente a livello di sorgente. Comunemente questi corsi temporali vengono chiamati "canali virtuali" perché riflettono il segnale che si registrerebbe se si ponesse un elettrodo direttamente in quella esatta locazione.

## Parcellizzazione del dato

La parcellizzazione consiste nella divisione del cervello in regioni distinte sulla base di criteri funzionali o anatomici. Per effettuare la parcellizzazione serve un atlas, ossia un atlante che indica le varie regioni di interesse e come i vari tessuti sono suddivisi. Per il nostro studio è stato utilizzato l'atlas Schaefer (Schaefer et al., 2018).

```
cfg = [];  
source_parcel = ft_sourceparcellate(cfg, source_int, atlas);
```

`Source_parcel` è una struttura che contiene l'andamento temporale dell'attività cerebrale per ogni regione dell'atlas.

## Estrazione dei microstati in sorgente con +microstate

Per l'estrazione dei microstati abbiamo scelto di utilizzare il tool +microstate sviluppato da Tait e Zhang nel 2022.

Il dato deve essere convertito nel formato di +microstate. Viene creato un oggetto "individual" a cui vengono poi assegnati i dati ottenuti dalla parcellizzazione, specificando la modalità in cui essi si presentano, "source", in sorgente.

```
ms = microstate.individual();  
ms = ms.import_fielddtrip(source_parcel, 'modality', 'source');
```

Utilizzando la funzione `individual.cluster_estimatemaps(k)`; vengono stimate le cinque mappe topografiche utili al nostro studio.

## Plot dei risultati

Per la visualizzazione dei risultati si utilizza la funzione `ms.plot('maps', layout, 'cscale', [0.5,1])`; il layout è stato creato tramite la funzione di +microstate `layout = microstate.functions.layout_creator(template, labels)`; Il file `.mat` creato da noi appositamente in quanto non presente nei modelli standard del tool e basato sull'atlas Schaefer, contiene le specifiche per il template.

## Procedimento con Cartool

Per avere un'ulteriore prova e un confronto sui risultati, il processo di segmentazione è stato svolto tramite Cartool, sugli stessi dati e sullo stesso soggetto utilizzato in precedenza.

Cartool nel processo di segmentazione applica tre step:

- 1) Clustering
- 2) Post-processing temporale
- 3) Computazione di misure qualitative

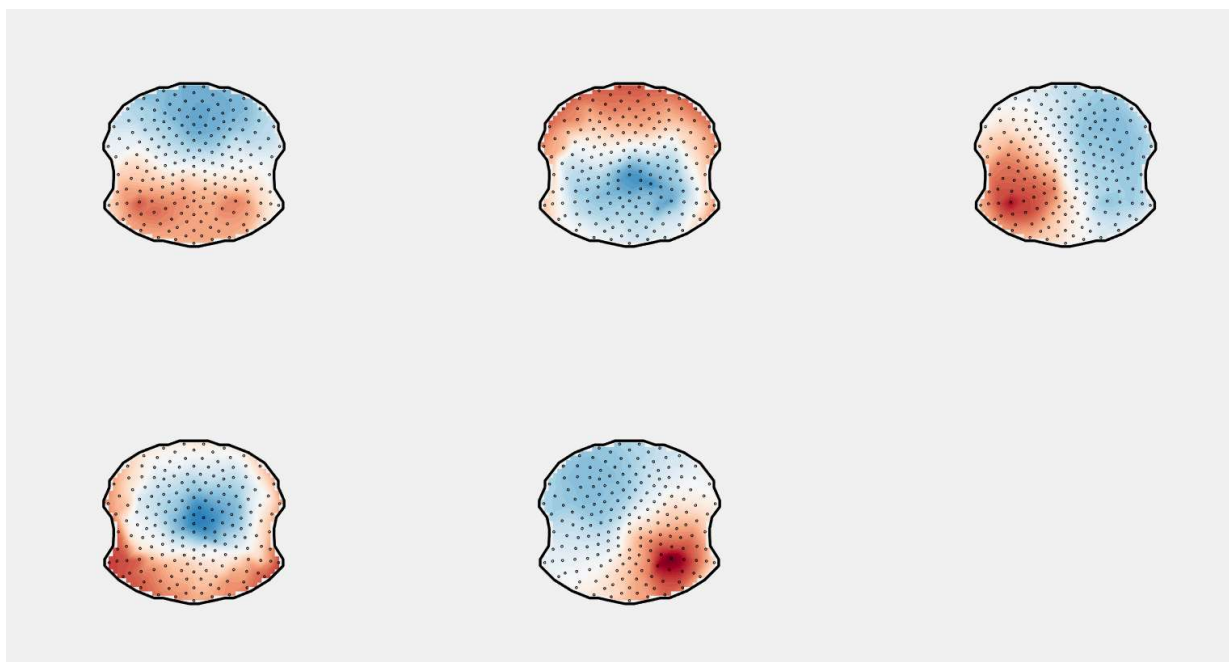
Per il clustering sono disponibili vari algoritmi, è stato però scelto il k-means per poter effettuare confronti successivi. Per vedere nel dettaglio la procedura seguita da Cartool e per ulteriori spiegazioni sul tool stesso si rimanda alla guida utente alla voce "Segmentation of EEG files into micro-states" e all'articolo di (Brunet et al., 2011).

# Risultati

## Microstati sullo scalpo

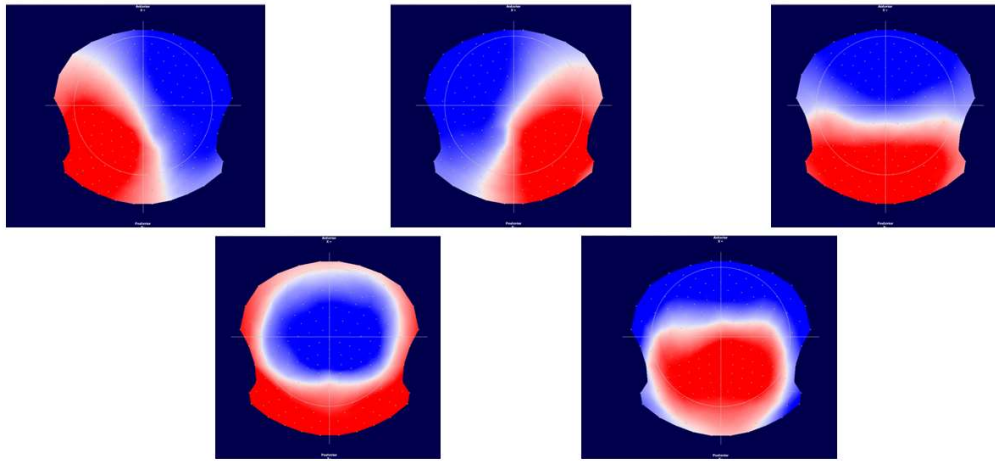
Dopo aver applicato la pipeline per l'estrazione sullo scalpo si ottengono le seguenti mappe topografiche che rappresentano le cinque classi dei microstati, quattro canoniche e una quinta aggiuntiva rappresentativa di un soggetto sano nel contesto della sclerosi multipla (mappa F) come riportato dalla letteratura (Baldini et al., 2023, Custo et al., 2017).

Questo perché, anche se si tratta di un soggetto patologico, non è sempre detto che presenti una mappa E prevalente.



**Fig. 11:** Mappe topografiche delle cinque classi di microstati estratte da rilevazioni sullo scalpo

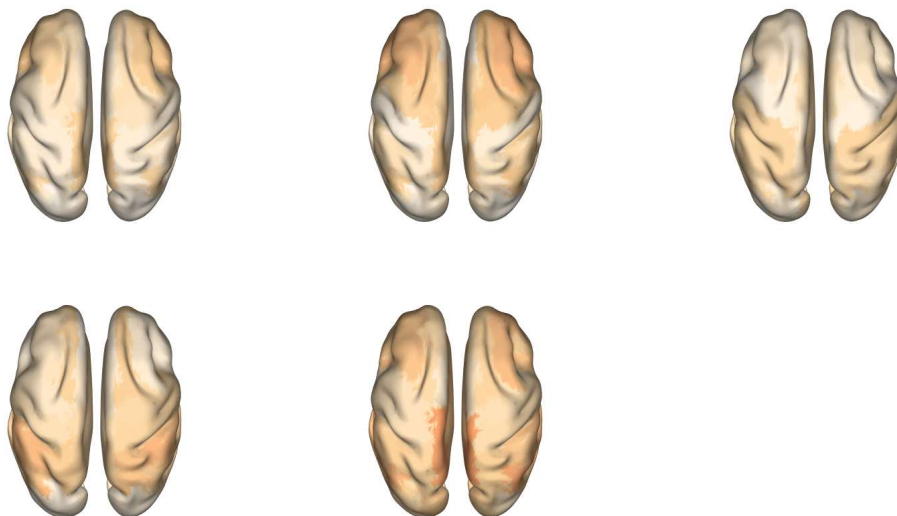
Tramite Cartool è stata ripetuta la pipeline di segmentazione per l'estrazione dei microstati sullo scalpo, sui dati EEG dello stesso soggetto innanzitutto per poter confrontare i risultati che si ottengono da tool diversi e successivamente per verificare che i dati forniti fossero attendibili. I risultati si presentano uguali a meno della colormap che nei due tool differisce, presentandosi più intensa in Cartool.



*Fig. 12: Mappe topografiche delle cinque classi di microstati estratte tramite Cartool da rilevazioni sullo scalpo*

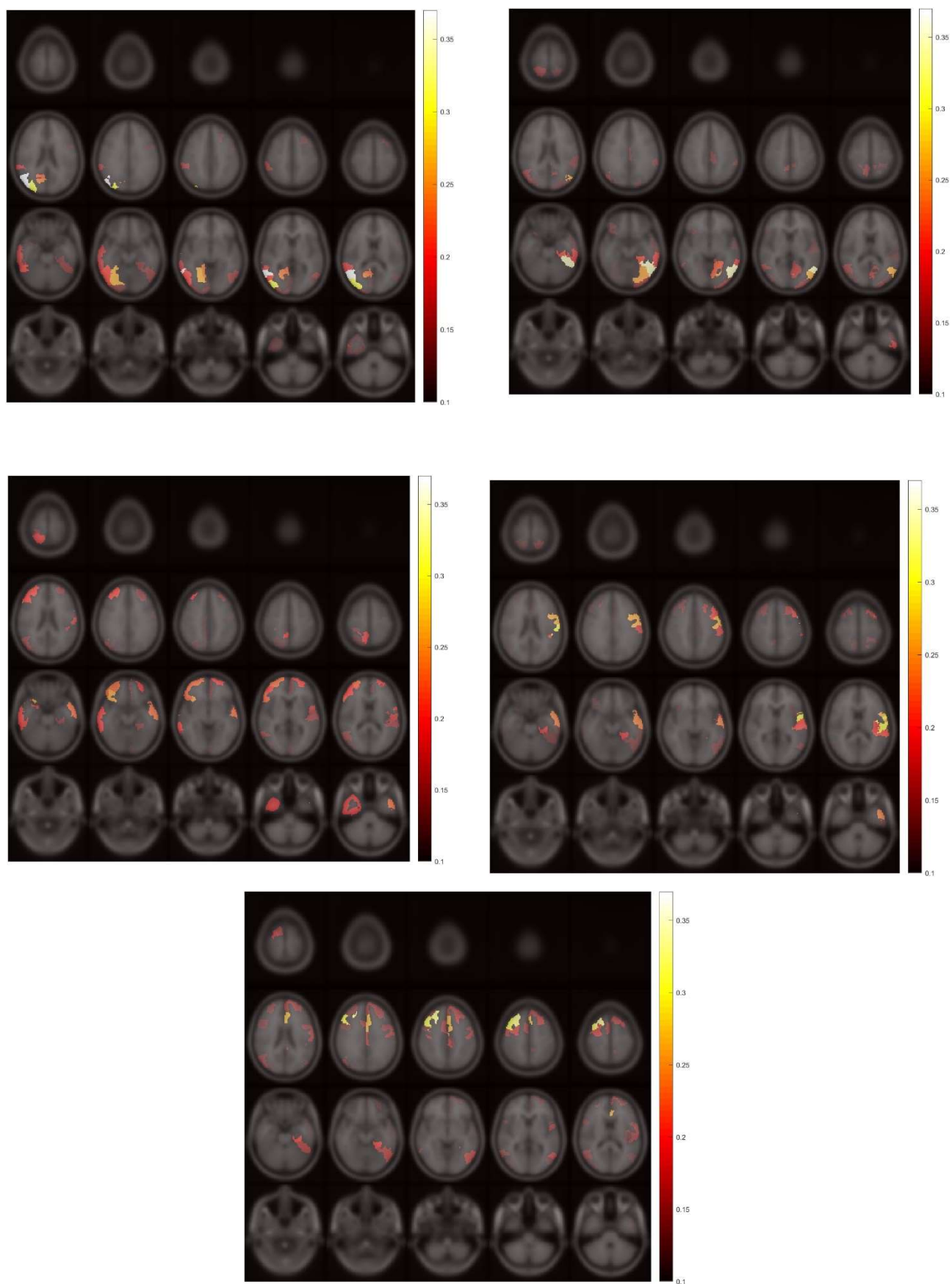
## Microstati in sorgente

I risultati ottenuti tramite lo studio in sorgente sono stati plottati con la funzione di `+microstate` e il risultato è visibile in figura.



*Fig. 13: Risultati dell'estrazione dei microstati in sorgente tramite l'uso di `+microstate`*

Per avere un risultato che mostrasse un'attivazione all'interno del cervello è stato effettuato un plot tramite la funzione `ft_sourceplot()` di `fieldtrip`.



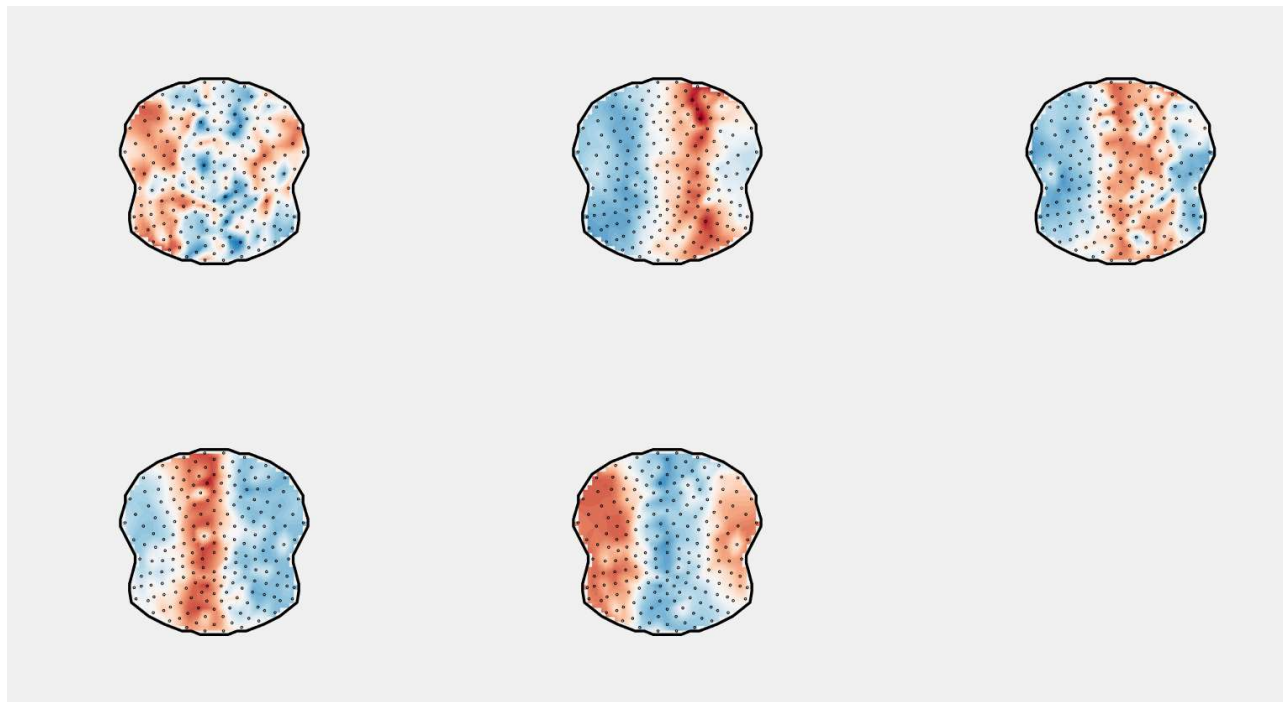
**Fig. 14:** Risultati trovati tramite la funzione `ft_sourceplot()` di Fieldtrip per la visione delle sorgenti cerebrali attive nei cinque microstati

# Discussione

## Risultati sullo scalpo

I risultati presentati sono stati ottenuti dopo vari aggiustamenti, partendo da una prima applicazione della pipeline in cui gli elettrodi non aderenti allo scalpo non erano ancora stati rimossi.

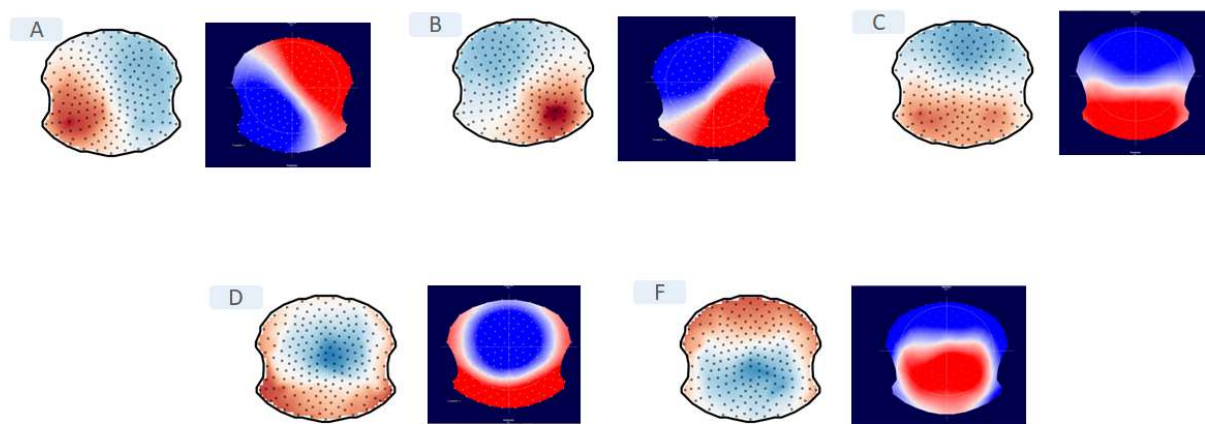
Come visibile nella figura sottostante, i microstati non risultano essere riconducibili alla letteratura né a quelli ottenuti dall'Università di Trieste tramite Cartool.



*Fig. 15: Primi risultati ottenuti*

Ipotizzando che l'errore fosse nel montaggio non adeguato, è stato creato il file egi204.mat per avere un template che permettesse di creare un layout adatto ai dati, ottenendo però gli stessi risultati. Per questo motivo è stata spostata l'attenzione sul fatto che il problema potesse essere di visualizzazione anziché di calcolo o di applicazione delle varie metodologie, sono state pertanto modificate alcune funzioni del tool che non hanno però condotto a risultati differenti.

Successivamente è stata riscontrata una differenza nel montaggio degli elettrodi utilizzati per le analisi e quello effettivo della macchina con cui è stato registrato l'EEG del soggetto preso in esame. Essendo la disposizione e le coordinate degli elettrodi differenti da quelle effettive, sono state modificate e gli elettrodi non aderenti allo scalpo sono stati rimossi ottenendo così dei risultati completamente diversi, come visibile in Fig. 16 e da quella presentata nella sezione risultati.



**Fig. 16:** risultati dell'estrazione sullo scalpo a confronto, +microstate e Cartool

I risultati ottenuti attraverso la pipeline eseguita in +microstate sono paragonabili a quelli forniti inizialmente dall'università di Trieste e anche a quelli presenti nella letteratura. Ripetendo la procedura su Cartool sugli stessi dati individuali del singolo soggetto, si ottengono gli stessi risultati. L'inversione di polarità che si nota nella mappa F è causata dall'oscillazione dei generatori in sorgente e nello studio dei microstati viene generalmente ignorata.

## Risultati in Sorgente

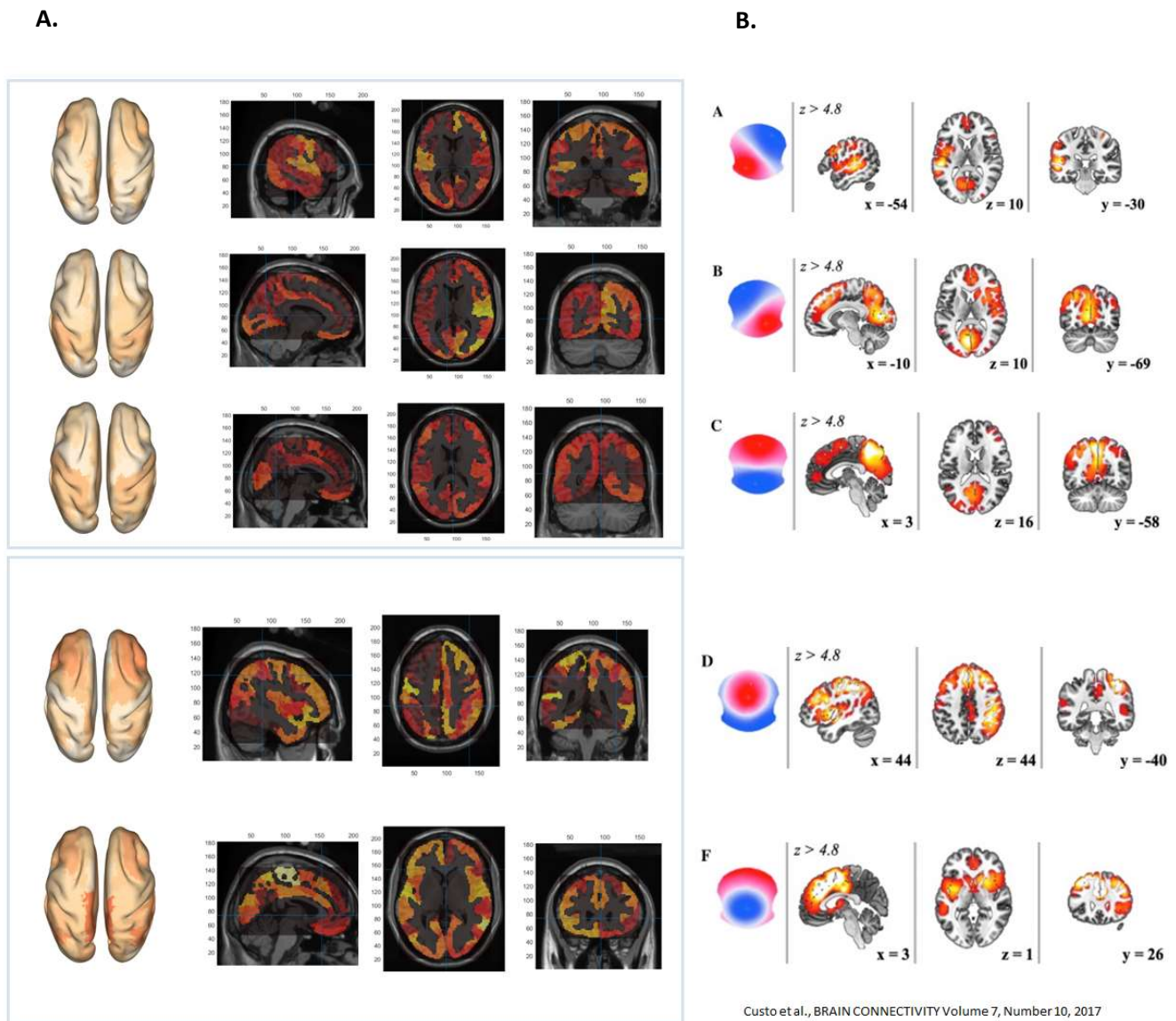
Inizialmente, i risultati ottenuti non erano attendibili, mostravano una minima attivazione laterale che si presentava uguale per ognuna delle cinque classi. Per ottenere risultati più attendibili che mostrassero un'attivazione cerebrale maggiore e ben distribuita, la funzione `individual.plot()` del tool +microstate è stata modificata per risolvere le incongruenze trovate rispetto alla funzione `cohort.plot()` e correggere gli errori presenti.

I risultati presentati in Fig.12 sono quelli ottenuti a seguito delle correzioni effettuate, sebbene siano corretti mostrano un'attivazione solo a livello esterno sulla corteccia cerebrale. Per poter visualizzare un'attivazione interna e capire esattamente le zone attive in un determinato microstato cerebrale è stato effettuato il plot tramite la funzione di FieldTrip `ft_sourceplot()` sovrapponendo l'attivazione cerebrale ad un'immagine MRI. Tenendo conto che l'operazione è stata effettuata su un numero molto ridotto di campioni (8000) rispetto al numero effettivo (158698), per poter consentire l'esecuzione del programma con la RAM a disposizione, si ottengono i risultati riportati in Fig. 13.

Per effettuare il plot, è stato utilizzato il parametro funzionale 'pow' sostituito con il microstato in sorgente ottenuto dalle precedenti computazioni. Sono stati ricomputati i risultati in alcune



coordinate specifiche presentate nell'articolo di Custo et al., (2017) utilizzando un numero superiore di punti temporali. I risultati ottenuti sono visibili in Fig. 16 A, ed essi mostrano attraverso colori differenti la diversa attivazione delle zone cerebrali per il determinato microstato. Si è cercato poi di paragonare i risultati ottenuti dalla nostra pipeline con quelli presentati nell'articolo di Custo et al., (2017) per capire se risultati ottenuti da due procedure differenti potessero essere messi a confronto, almeno visivamente, cercando di associare i nostri risultati ad una mappa topografica specifica.



**Fig. 17:** **A.** Risultati dell'estrazione in sorgente ottenuti tramite +microstate e Fieldtrip. **B.** Risultati presentati da Custo et al., 2017 ottenuti tramite metodologia TESS

Non è possibile trovare un'associazione precisa, le pipeline seguite sono nettamente differenti e anche i software utilizzati per le computazioni. È comunque interessante notare le diverse attivazioni cerebrali presentate e come per alcuni si presenti una somiglianza.

## Conclusione

A fronte degli obiettivi iniziali, la pipeline per l'estrazione dei microstati sullo scalpo è stata generata e ha prodotto i risultati che ci aspettavamo. I microstati estratti sono riconducibili alla letteratura e la pipeline eseguita ha mostrato la presenza di una quinta mappa tipicamente associata a soggetti sani, nonostante il soggetto analizzato sia un soggetto patologico. Va comunque ricordato che gli studi presentati in precedenza sono studi di gruppo e che la mappa F sebbene sia prevalente nei soggetti sani non esclude che sia presente anche in soggetti patologici. La pipeline per l'estrazione dei microstati in sorgente ci ha concesso di capire un singolo microstato da che sorgenti fosse generato mostrando le regioni attive in profondità in uno stato di riposo. L'utilizzo dei vari tool ha permesso di capirne la versatilità e l'interazione che questi hanno tra loro, come gestire il dato e come convertirlo nei vari formati adeguati allo scopo. Nonostante +microstate sia ancora poco documentato e alcune funzioni vadano riviste, ha ottime potenzialità soprattutto per la flessibilità di utilizzo rispetto a tools ad interfaccia grafica come CARTOOL ed è molto specifico per l'estrazione dei microstati consentendo di lavorare sia sullo scalpo che in sorgente.

In futuro questo studio potrebbe essere ampliato adattando la pipeline su un gruppo patologico di soggetti per poter svolgere analisi di gruppo. Inoltre, lo studio della connettività funzionale tra le zone attive di ogni microstato è di particolare interesse per la comprensione dei microstati in maniera più completa.

# Riferimenti

## Bibliografia

- Baldini, Sara, Maria Elisa Morelli, Arianna Sartori, Fulvio Pasquin, Alessandro Dinoto, Alessio Bratina, Antonio Bosco, e Paolo Manganotti. «Microstates in Multiple Sclerosis: An Electrophysiological Signature of Altered Large-Scale Networks Functioning?» *Brain Communications* 5, fasc. 1 (29 dicembre 2022): fcac255. <https://doi.org/10.1093/braincomms/fcac255>.
- Brunet, Denis, Micah M. Murray, e Christoph M. Michel. «Spatiotemporal Analysis of Multichannel EEG: CARTOOL». *Computational Intelligence and Neuroscience* 2011 (2011): 1–15. <https://doi.org/10.1155/2011/813870>.
- Custo, Anna, Dimitri Van De Ville, William M. Wells, Miralena I. Tomescu, Denis Brunet, e Christoph M. Michel. «Electroencephalographic Resting-State Networks: Source Localization of Microstates». *Brain Connectivity* 7, fasc. 10 (dicembre 2017): 671–82. <https://doi.org/10.1089/brain.2016.0476>.
- Custo, Anna, Serge Vulliemoz, Frederic Grouiller, Dimitri Van De Ville, e Christoph Michel. «EEG Source Imaging of Brain States Using Spatiotemporal Regression». *NeuroImage* 96 (agosto 2014): 106–16. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2014.04.002>.
- Dighriri, Ibrahim M, Ahoud A Aldalbahi, Fatimah Albeladi, Asimah A Tahiri, Elaf M Kinani, Rand A Almohsen, Nouf H Alamoudi, et al. «An Overview of the History, Pathophysiology, and Pharmacological Interventions of Multiple Sclerosis». *Cureus*, 2 gennaio 2023. <https://doi.org/10.7759/cureus.33242>.
- Khanna, Arjun, Alvaro Pascual-Leone, Christoph M. Michel, e Faranak Farzan. «Microstates in Resting-State EEG: Current Status and Future Directions». *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* 49 (febbraio 2015): 105–13. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2014.12.010>.
- Lehmann, D, H Ozaki, e I Pal. «EEG Alpha Map Series: Brain Micro-States by Space-Oriented Adaptive Segmentation i», s.d.
- Liu, Hong, Haoling Tang, Wei Wei, Gesheng Wang, Yong Du, e Jianghai Ruan. «Altered Peri-Seizure EEG Microstate Dynamics in Patients with Absence Epilepsy». *Seizure* 88 (maggio 2021): 15–21. <https://doi.org/10.1016/j.seizure.2021.03.020>.
- Michel, Christoph M., e Thomas Koenig. «EEG Microstates as a Tool for Studying the Temporal Dynamics of Whole-Brain Neuronal Networks: A Review». *NeuroImage* 180 (ottobre 2018): 577–93. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2017.11.062>.
- Oostenveld, Robert, Pascal Fries, Eric Maris, e Jan-Mathijs Schoffelen. «FieldTrip: Open Source Software for Advanced Analysis of MEG, EEG, and Invasive Electrophysiological Data». *Computational Intelligence and Neuroscience* 2011 (2011): 1–9. <https://doi.org/10.1155/2011/156869>.
- Pascual-Marqui, R.D., C.M. Michel, e D. Lehmann. «Segmentation of Brain Electrical Activity into Microstates: Model Estimation and Validation». *IEEE Transactions on Biomedical Engineering* 42, fasc. 7 (luglio 1995): 658–65. <https://doi.org/10.1109/10.391164>.

- Pascual-Marqui, Roberto D. «Discrete, 3D Distributed, Linear Imaging Methods of Electric Neuronal Activity. Part 1: Exact, Zero Error Localization». arXiv, 18 ottobre 2007. <http://arxiv.org/abs/0710.3341>.
- Schaefer, Alexander, Ru Kong, Evan M Gordon, Timothy O Laumann, Xi-Nian Zuo, Avram J Holmes, Simon B Eickhoff, e B T Thomas Yeo. «Local-Global Parcellation of the Human Cerebral Cortex from Intrinsic Functional Connectivity MRI». *Cerebral Cortex* 28, fasc. 9 (1 settembre 2018): 3095–3114. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhx179>.
- Tait, Luke, e Jiaxiang Zhang. «+microstate: A MATLAB Toolbox for Brain Microstate Analysis in Sensor and Cortical EEG/MEG». *NeuroImage* 258 (settembre 2022): 119346. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2022.119346>.
- . «MEG Cortical Microstates: Spatiotemporal Characteristics, Dynamic Functional Connectivity and Stimulus-Evoked Responses». *NeuroImage* 251 (maggio 2022): 119006. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2022.119006>.
- Tomescu, M.I., T.A. Rihs, V. Rochas, M. Hardmeier, J. Britz, G. Allali, P. Fuhr, S. Eliez, e C.M. Michel. «From Swing to Cane: Sex Differences of EEG Resting-State Temporal Patterns during Maturation and Aging». *Developmental Cognitive Neuroscience* 31 (giugno 2018): 58–66. <https://doi.org/10.1016/j.dcn.2018.04.011>.
- Van Den Heuvel, Martijn P., e Hilleke E. Hulshoff Pol. «Exploring the Brain Network: A Review on Resting-State fMRI Functional Connectivity». *European Neuropsychopharmacology* 20, fasc. 8 (agosto 2010): 519–34. <https://doi.org/10.1016/j.euroneuro.2010.03.008>.

## Sitografia

FieldTrip: <https://www.fieldtriptoolbox.org/>

EEGLAB: <https://sccn.ucsd.edu/eeglab/index.php>

+microstate: <https://github.com/plus-microstate/plus-microstate.github.io>

Cartool: <https://sites.google.com/site/cartoolcommunity/home?authuser=0>

## *Ringraziamenti*

Per terminare, vorrei dedicare questo spazio per rivolgere i miei ringraziamenti a tutte le persone a me più vicine.

Innanzitutto, un ringraziamento alla relatrice Storti Silvia Francesca per avermi dato questa opportunità e al mio correlatore Paolini Edoardo, per il suo prezioso aiuto nel condurre questo lavoro e per la sua infinita pazienza e gentilezza.

Un enorme grazie alla mia famiglia a cui voglio un bene dell'anima e ai miei amici, per aver alleggerito tanti momenti, per avermi regalato gioia e risate.

Grazie alla mia mamma, perché in ogni suo modo mi ha sempre sostenuta, fidandosi di me e delle mie decisioni.

Grazie a Marianna, perché ha sempre portato pazienza nei miei confronti, anche quando prendevo il completo possesso della scrivania; non sarai mai grande abbastanza, rimani sempre la mia sorellina.

Grazie nonni, siete il mio amore più grande e non riesco ad immaginarmi senza di voi.

Un ringraziamento dal cuore a Ted, per essermi sempre stato accanto e per essersi preso cura di me, mai come ora ti ho sentito lontano ma rimani una delle persone più importanti nella mia vita.

Grazie ad Arianna, per essermi vicina da sempre e per avermi consigliato ed incoraggiato a fare del mio meglio, in ogni situazione.

Grazie a Denise, Lisa, Martina, Bongio, Gioele e Biabbia, che mi accompagnano dalle scuole superiori, con la quale sono cresciuta, per tutti i momenti bellissimi passati insieme.

Grazie ai miei colleghi di lavoro in pizzeria, perché con voi mi sono trovata bene fin da subito ed è un piacere starvi accanto.

Grazie a Nicole, per avermi fatta sentire a casa ed avermi accompagnata in uno degli anni più belli ma anche più critici del mio percorso universitario, sarai sempre la mia coinquilina anche se al momento sei dall'altra parte del mondo.

Grazie ad Anthony, sei per me una boccata d'aria; è difficile raccontarci, ma grazie per tutto ciò che stai facendo per me, nel mio futuro mi auguro di averti al mio fianco.

Un ringraziamento speciale va a Sara, molto più che una collega di università.

Perché in te ho trovato un'amica, e sei stata di fondamentale importanza; senza di te quest'ultimo anno non sarebbe stato lo stesso.

Ringrazio poi tutte le persone che non ho nominato esplicitamente, ma che hanno un ruolo fondamentale nella mia vita, perché i ricordi con voi sono e saranno per sempre impressi nel cuore.

Grazie infinite a tutti voi.

E infine, ovviamente, un enorme e speciale ringraziamento va a me stessa, per tutte le decisioni prese e i momenti superati, anche quelli in cui mi sono concessa di crollare o fermarmi a respirare. È stato un percorso pieno di alti e bassi, che mi ha permesso di vivere diverse esperienze e che ha comportato alcune rinunce ma anche tantissime soddisfazioni.

Ancora mi sembra inverosimile che sia giunto a conclusione, ripensando a tutte le volte in cui ho preso in considerazione di abbandonare perché non mi sono sentita all'altezza; questo lo rende ancora più prezioso.

Grazie.