

ISTITUTO SUPERIORE DI SANITÀ

**Pupillometria digitale: problematiche,
soluzioni tecnologiche e prospettive**

Vincenzo Barbaro, Pietro Bartolini,
Giovanni Calcagnini e Federica Censi
Laboratorio di Ingegneria Biomedica

[Faint, illegible text, likely bleed-through from the reverse side of the page]

ISSN 1123-3117

Rapporti ISTISAN

00/35

Istituto Superiore di Sanità

Pupillometria digitale: problematiche, soluzioni tecnologiche e prospettive.

Vincenzo Barbaro, Pietro Bartolini, Giovanni Calcagnini e Federica Censi

2000, 46 p. Rapporti ISTISAN 00/35

Lo studio delle fluttuazioni del diametro pupillare è da sempre stato considerato un potenziale metodo per ottenere informazioni rilevanti sul funzionamento del sistema nervoso centrale. Nonostante i dati di letteratura, la pupillometria non ha ancora trovato una sufficiente attenzione in ambito fisiopatologico e/o clinico. Le difficoltà tecnologiche insite nella metodologia rappresentano sicuramente il più grande impedimento ad un più diffuso utilizzo. In questo lavoro è stato presentato un sistema pupillografico basato sulle più recenti tecnologie digitali, di facile utilizzo e soprattutto facilmente integrabile con le altre metodiche strumentali tipicamente impiegate nell'esplorazione funzionale neurologica e neurovegetativa. Sono inoltre presentati alcuni risultati, di carattere preliminare, che evidenziano la fattibilità dell'approccio integrato proposto.

Parole chiave: Diametro pupillare, Elaborazione delle immagini, Sistema neurovegetativo

Istituto Superiore di Sanità

Digital Pupillometry: problems, technological solutions and perspectives.

Vincenzo Barbaro, Pietro Bartolini, Giovanni Calcagnini and Federica Censi

2000, 46 p. Rapporti ISTISAN 00/35 (in Italian)

The analysis of the spontaneous pupil diameter fluctuations has always been considered a promising method to obtain relevant information about the central nervous system functioning. Despite literature data, pupillometry has not yet gained large interest for pathophysiologic and clinical investigations. The technological difficulties of the methodology are the most important limitations for a wider diffusion. In this work, a pupillographic system is presented, based on the most recent digital technologies, easy to use and suitable to be integrated with the instruments typically adopted for the neurologic and autonomic investigations. Some preliminary results are presented, to enhance the feasibility of the proposed methodology.

Key words: Autonomic nervous system, Image processing, Pupil diameter

Gli autori desiderano ringraziare i sigg. Giorgio De Angelis, Alessandro Fasano e Giuseppe Di Cintio per l'aiuto nella realizzazione del supporto della telecamera, il Dott. Stefano Lino per i suggerimenti e la disponibilità durante l'acquisizione dei dati sperimentali e l'ing. Giuseppe D'Avenio per il supporto nella realizzazione della documentazione fotografica.

INDICE

INTRODUZIONE	1
1. CENNI DI FISIOLOGIA ED ANATOMIA DEL CONTROLLO PUPILLARE	3
1.1 Il controllo del diametro della pupilla.....	3
1.2 Il sistema parasimpatico pupillare.....	4
1.3 Il sistema simpatico pupillare.....	11
1.4 I riflessi pupillari.....	13
2. ANALISI DELLE FLUTTUAZIONI DEL DIAMETRO PUPILLARE E SIGNIFICATO CLINICO	15
3. PUPILLOMETRIA E PUPILLOGRAFIA	17
4. PROGETTO E REALIZZAZIONE DI UN SISTEMA PUPILLOGRAFICO INNOVATIVO	20
4.1 Acquisizione dell'immagine pupillare.....	20
4.2 Calibrazione del pupillometro.....	25
4.3 Algoritmo di riconoscimento e misura del diametro pupillare.....	25
4.3.1 <i>Algoritmo di riconoscimento</i>	25
4.3.2 <i>Algoritmo di misura</i>	29
4.3.3 <i>Valutazione dell'accuratezza</i>	33
5. STUDIO SPERIMENTALE SUL CONTROLLO NEUROVEGETATIVO DELLA PUPILLA	34
5.1 Protocollo e setup sperimentale.....	34
5.2 Preelaborazione dei dati.....	36
5.3 Le serie di variabilità.....	38
5.4 Risultati.....	41
CONCLUSIONI E PROSPETTIVE	43
BIBLIOGRAFIA	45

INTRODUZIONE

L'analisi delle variazioni del diametro pupillare in varie condizioni ha sempre suscitato notevole interesse nello studio di disturbi visivi, di problemi neurologici e di patologie legate al sistema nervoso autonomo. L'esame della pupilla è infatti ritenuto una misura oggettiva dell'integrità dei percorsi visivi afferenti e dell'innervazione simpatica e parasimpatica dell'occhio nonché di stati mentali di stress, di affaticamento, di concentrazione. In ambito clinico l'analisi del diametro pupillare riveste un ruolo fondamentale sia nella diagnosi di patologie legate ai suoi propri meccanismi di controllo, sia soprattutto come indice secondario di patologie neurologiche a carico di altri centri nervosi, ad essi funzionalmente o anatomicamente connessi. Neppure la recente disponibilità di sofisticati strumenti di esame neurologici per immagini (in particolare la Tomografia Assiale Computerizzata e la Risonanza Magnetica Nucleare) ha ridotto l'importanza dei test pupillometrici che continuano ad essere largamente impiegati tra gli esami neurologici preliminari.

Le prime ricerche riguardanti la pupilla risalgono a più di 40 anni fa. In particolare sono state oggetto di studio le fluttuazioni spontanee del diametro pupillare e le caratteristiche della risposta pupillare a variazioni dell'illuminazione ambientale, alla somministrazione di farmaci, o durante particolari stati psicologici. I risultati ottenuti suggeriscono che la pupillometria potrebbe fornire informazioni importanti per un numero elevato di patologie come la depressione, il morbo di Alzheimer, il diabete, l'alcolismo, la sclerosi multipla. Per quanto riguarda lo studio del sistema nervoso autonomo, l'analisi delle fluttuazioni del diametro pupillare potrebbe assumere un'importanza notevole nell'identificazione dei meccanismi di funzionamento del sistema neurovegetativo e nella definizione di indici di attività autonoma. Questa deriva, oltre che dalla centralità delle fibre nervose pupillari, anche dalla presumibile assenza di effetti di disturbo diretti di origine meccanica, che influenzano e talvolta falsano l'analisi dei ritmi condotta sugli altri segnali di variabilità. E' spesso infatti difficile valutare con certezza in che misura comportamenti ritmici presenti nei segnali cardiovascolari comunemente analizzati (variabilità cardiaca e pressione arteriosa) siano dovuti ad autoscillazioni spontanee autonome, ovvero vengano evocate da periodiche variazioni di pressione arteriosa in distretti critici riconducibili a conseguenze emodinamiche dirette dell'attività respiratoria. Estendere le teorie interpretative delle componenti ritmiche neurovegetative al segnale pupillare metterebbe a disposizione dello studio (e un domani auspicabilmente anche della pratica clinica) un potente indicatore, presumibilmente indipendente da interazioni meccaniche di attività autonoma centrale.

La maggior parte delle metodiche di analisi tutt'ora adottate si basano su una misura statica dell'ampiezza dall'apertura pupillare, in risposta a somministrazioni locali di farmaci e/o a condizioni di illuminazione ambientale differenti. Più raramente

viene anche misurata la velocità di costrizione e/o dilatazione pupillare in risposta ad un repentino modificarsi della illuminazione ambientale.

Alla luce delle metodiche di analisi ed estrazione di informazione disponibili e di fatto utilizzate per lo studio di altre variabili biologiche (a titolo di esempio si consideri l'analisi del segnale elettroencefalografico oppure elettrocardiografico), l'analisi del diametro pupillare appare ancora scarsamente approfondita. Una possibile causa di tale arretratezza è ricercabile nella difficoltà incontrata nel passato di ottenere delle registrazioni continue delle fluttuazioni del diametro pupillare in formati disponibili per l'utilizzo di tecniche di elaborazione e/o identificazione modellistica di tipo avanzato. Il recente sviluppo di hardware e software per l'acquisizione di sequenze video, prevalentemente sospinto dall'interesse commerciale verso applicazioni di tipo multimediale, permette oggi lo sviluppo di sistemi digitali di acquisizione continua e prolungata di tracciati pupillometrici.

Obiettivo del presente lavoro è la realizzazione di un sistema pupillografico portatile, di tipo digitale, utilizzabile come elemento di un sistema di acquisizione multiparametrico di segnali fisiologici. Il sistema prevede l'acquisizione dell'immagine pupillare mediante una microtelecamera CCD ad infrarossi montata su un caschetto oculistico e collegata ad un convertitore A/D. Un software appropriato permette il riconoscimento automatico del diametro pupillare e l'eliminazione degli artefatti dovuti alla chiusura delle palpebre. Il sistema sviluppato permette dunque l'analisi dinamica delle modificazioni del diametro pupillare. Come esempio di applicazione nel campo della ricerca fisiopatologica, il sistema è usato con l'obiettivo di stabilire se sono presenti ritmi caratteristici nel segnale di variabilità spontanea del diametro pupillare e in che misura questi sono legati alle oscillazioni presenti nei segnali di variabilità del ritmo cardiaco e della pressione arteriosa sistemica.

1. CENNI DI FISIOLOGIA ED ANATOMIA DEL CONTROLLO PUPILLARE

Il sistema nervoso autonomo è preposto all'innervazione della muscolatura liscia, delle ghiandole e del miocardio. Il suo compito è di mantenere costante lo stato dell'organismo anche in condizioni di emergenza; a tal fine regola parzialmente o totalmente variabili quali la circolazione, la respirazione, il metabolismo, la temperatura corporea, ecc. In particolare il sistema nervoso autonomo oculare innerva i muscoli dilatatore e sfintere della pupilla e controlla il muscolo ciliare, responsabile dell'accomodazione, e la ghiandola lacrimale, cioè tutte quelle azioni muscolari e quelle funzioni legate all'apparato visivo che sono sottratte al controllo della volontà.

1.1 Il controllo del diametro della pupilla

La funzione della pupilla, esclusivamente ottica, è quella di regolare la quantità di luce che raggiunge la retina, allo scopo di rendere ottimale l'acuità visiva. Tale quantità è proporzionale all'area della pupilla, ovvero al quadrato del suo diametro. Nell'uomo il diametro della pupilla può ridursi fino a circa 1.5 mm e aumentare fino a circa 8 mm. Grazie a questa variabilità dell'apertura pupillare, la quantità di luce che entra nell'occhio e che impressiona la retina può variare di circa trenta volte (1).

Accade quindi che, in condizioni di elevata illuminazione esterna, la pupilla si restringe per impedire l'abbagliamento, mentre all'oscurità si dilata per migliorare la sensibilità retinica. Il diametro pupillare nei soggetti svegli è la risultante delle condizioni di illuminazione ambientale e dell'adattamento a questa, degli stimoli emotivi e dell'affaticamento muscolare. Nel caso di stanchezza fisica molto accentuata si ha costrizione, mentre se la stanchezza è lieve si ha dilatazione.

Nei soggetti normali di età media, adattati al buio, in riposo ed in silenzio, il diametro pupillare è di circa 7 mm. Inoltre le pupille dei miopi sono in genere più larghe di quelle degli ipermetropi, come pure quelle delle persone con iridi chiare rispetto a quelle con iridi scuri.

Altra causa di restringimento è la visione da vicino, durante la quale il diametro pupillare diminuisce per ridurre le aberrazioni cromatiche e sferiche prodotte dal diottero oculare.

L'ampiezza della pupilla è regolata dai muscoli sfintere (o costrittore) e dilatatore, siti nell'iride, che esercitano azioni antagoniste. Il costrittore è costituito da fibre muscolari lisce che si raccolgono in una banda anulare lunga 0.7 mm e spessa 0.1-0.2 mm intorno al bordo pupillare. Il dilatatore è costituito da elementi *miopiteliali*, aventi cioè una struttura in parte di tipo muscolare ed in parte di tipo epiteliale. Questi elementi sono situati negli strati profondi dell'iride, con una disposizione radiale per cui dalla parte più esterna dell'iride si portano verso il bordo pupillare che tuttavia non

raggiungono. Questo muscolo è molto più sottile (3-4 μm) e più esteso del costrittore. Il muscolo sfintere ha un'innervazione prevalentemente parasimpatica. I corpi cellulari dei neuroni pregangliari parasimpatici costituiscono i nuclei di Edinger-Westphal (EW) nel mesencefalo; i loro prolungamenti si uniscono al terzo nervo cranico e raggiungono il ganglio ciliare nella cavità orbitaria; qui formano sinapsi con i neuroni postgangliari.

I centri parasimpatici pupillari (nuclei di EW) ricevono impulsi eccitatori che provocano costrizione (*miosi*), ed inibitori che provocano dilatazione (*midriasi*) della pupilla. I primi sono evocati dagli stimoli luminosi (riflesso fotomotore), gli altri provengono dall'ipotalamo, sono provocati dalle emozioni, e danno luogo alla cosiddetta midriasi emotiva.

Il muscolo dilatatore della pupilla è innervato dalla sezione simpatica del sistema nervoso autonomo. I neuroni simpatici pregangliari costituiscono i centri *ciliospinali di Budge*, uno per lato a livello del primo e secondo segmento del midollo dorsale. I loro prolungamenti raggiungono, attraverso la catena cervicale simpatica, il ganglio cervicale superiore, dove contraggono sinapsi con i neuroni postgangliari.

I centri di Budge sono collegati con l'ipotalamo mediante un sistema di fibre discendenti, il cui decorso nel tronco cerebrale non è del tutto noto; ricevono impulsi nervosi dall'ipotalamo causati da stimoli emotivi, che si traducono, a livello oculare, nella stimolazione del muscolo dilatatore e quindi in una midriasi (emotiva).

L'ampiezza del foro pupillare è dunque la risultante dell'equilibrio, o dello squilibrio, esistente fra l'attività simpatica e quella parasimpatica. La conferma di ciò, in condizioni fisiologiche, è data dal diverso comportamento della pupilla nel sonno; in questo caso è infatti presente miosi a causa della diminuzione del tono simpatico e della riduzione degli impulsi inibitori dell'ipotalamo sui nuclei di EW, con conseguente prevalenza del tono parasimpatico.

A causa delle connessioni centrali e del decorso periferico delle fibre preposte alla sua innervazione, la pupilla, pur avendo funzione solamente ottica, si comporta da vera e propria spia della reattività vegetativa sia a livello centrale che periferico.

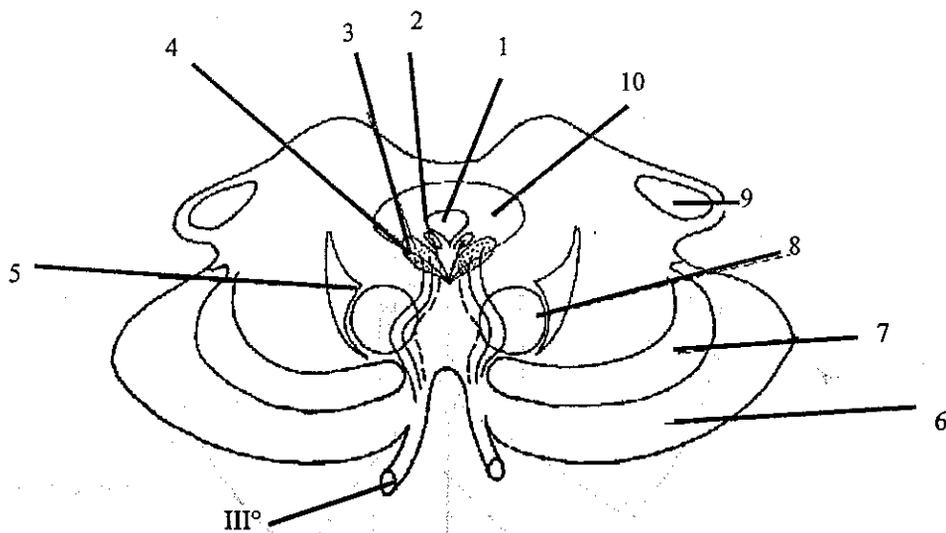
A livello centrale questa reattività si modifica sia in condizioni normali (sonno-veglia) che patologiche (coma-anestesia). A livello periferico risente delle lesioni lungo la catena neuronica, e l'impiego di adatti test permette talvolta di localizzare la sede della lesione, che può essere simpatica o parasimpatica, pre o postgangliare.

1.2 Il sistema parasimpatico pupillare

I corpi cellulari dei neuroni pregangliari parasimpatici pupillari si riuniscono nella parte superiore del mesencefalo, dove formano i già citati nuclei di EW, uno per lato. Tali strutture costituiscono la componente vegetativa del terzo nervo cranico. Questo nervo motore è di tipo misto, con una componente somatica per i muscoli oculari esterni (muscoli dei movimenti volontari dell'occhio e muscolo elevatore della palpebra), ed una componente vegetativa per lo sfintere della pupilla ed il muscolo ciliare (Figura 1).

I neuroni dei nuclei di EW possiedono una propria attività tonica, con meccanismi autoctoni, indipendenti da ogni riflesso, come è stato dimostrato sperimentalmente nel gatto, in cui l'interruzione di tutte le loro afferenze provoca pupillocostrizione. Questa risposta è espressione dell'attività tonica, normalmente mascherata dagli impulsi inibitori di origine ipotalamica.

Ciascun nucleo di EW provvede, oltre alla costrizione pupillare, anche all'innervazione del muscolo ciliare e quindi all'accomodazione. Nella scimmia è stato dimostrato che le due diverse stimolazioni si possono evocare stimolando con microelettrodi aree diverse: in particolare la stimolazione pupillare è evocata da una sollecitazione della parte anteriore dei nuclei; al contrario la sollecitazione della porzione posteriore provoca una risposta dei muscoli ciliari.



1. *Acquedotto cerebrale.*
2. *Nucleo di E-W.*
3. *Nuclei somatici del III.*
4. *Fascicolo longitudinale mediale.*
5. *Lemisco mediale.*
6. *Peduncolo cerebrale.*
7. *Sostanza nera.*
8. *Nucleo rosso.*
9. *Corpo genicolato mediale.*
10. *Sostanza grigia centrale.*

Figura 1.- *Disegno schematico di una sezione del mesencefalo.*

Le fibre nervose della porzione vegetativa del terzo nervo cranico si riuniscono con quelle della componente somatica per formare la radice del nervo. Questa per

fuoriuscire dal tronco cerebrale attraversa, nel mesencefalo, il *nucleo rosso* e la *sostanza nera* con un percorso arcuato (Figura 1). A questo livello le fibre autonome e quelle somatiche sono mescolate fra loro, tanto che un'eventuale lesione provoca invariabilmente effetti sull'uno e l'altro sistema.

Uscite dal tronco encefalico, le fibre nervose del terzo nervo cranico si riuniscono a formare il nervo vero e proprio che decorre in avanti per raggiungere la cavità orbitale. Dopo aver costeggiato il margine del *tentorio del cervelletto* (Figura 2), il nervo penetra nel *seno cavernoso* (Figura 3). Nel "tronco" del nervo sono state individuate delle fibre più spesse (12-15 μm) che condurrebbero gli impulsi per la porzione somatica, e delle fibre più sottili (3-5 μm) per la porzione viscerale.

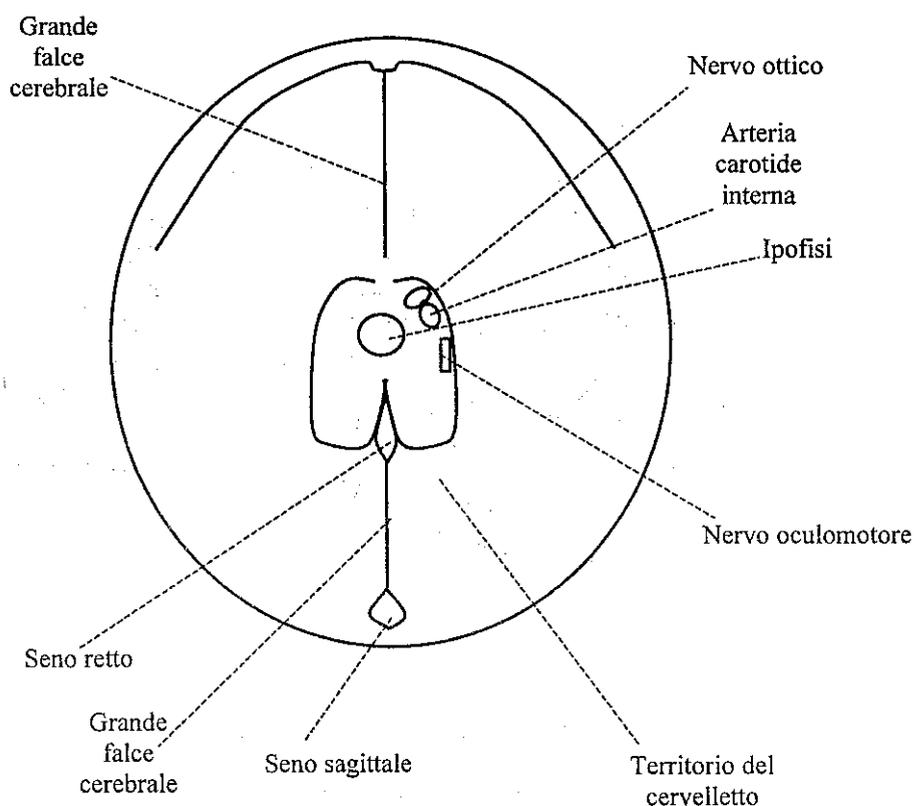


Figura 2.- Sezione trasversale del cranio

Penetrato dunque nel seno cavernoso, il nervo occupa una posizione superiore, attraversa il seno, e, in corrispondenza della fessura orbitaria, si divide in due rami, uno superiore ed uno inferiore. Le fibre autonome seguono il ramo inferiore, che presto abbandonano per raggiungere il ganglio ciliare di cui costituiscono la radice motoria (Figura 3).

Il ganglio ciliare è una piccola formazione appiattita, della grandezza di qualche millimetro, sito a circa 2 cm dal globo oculare, lateralmente al nervo ottico, con tre radici. La prima è la radice motoria, costituita come abbiamo visto dalle fibre autonome

del terzo nervo cranico, che nel ganglio contraggono sinapsi con i neuroni postgangliari (caratteristica comune del sistema nervoso parasimpatico è la prossimità dei gangli agli organi effettori). Le altre due radici sono rispettivamente una radice sensitiva, preposta a trasmettere la sensibilità corneale, ed una radice simpatica che contiene fibre vasomotorie oculari.

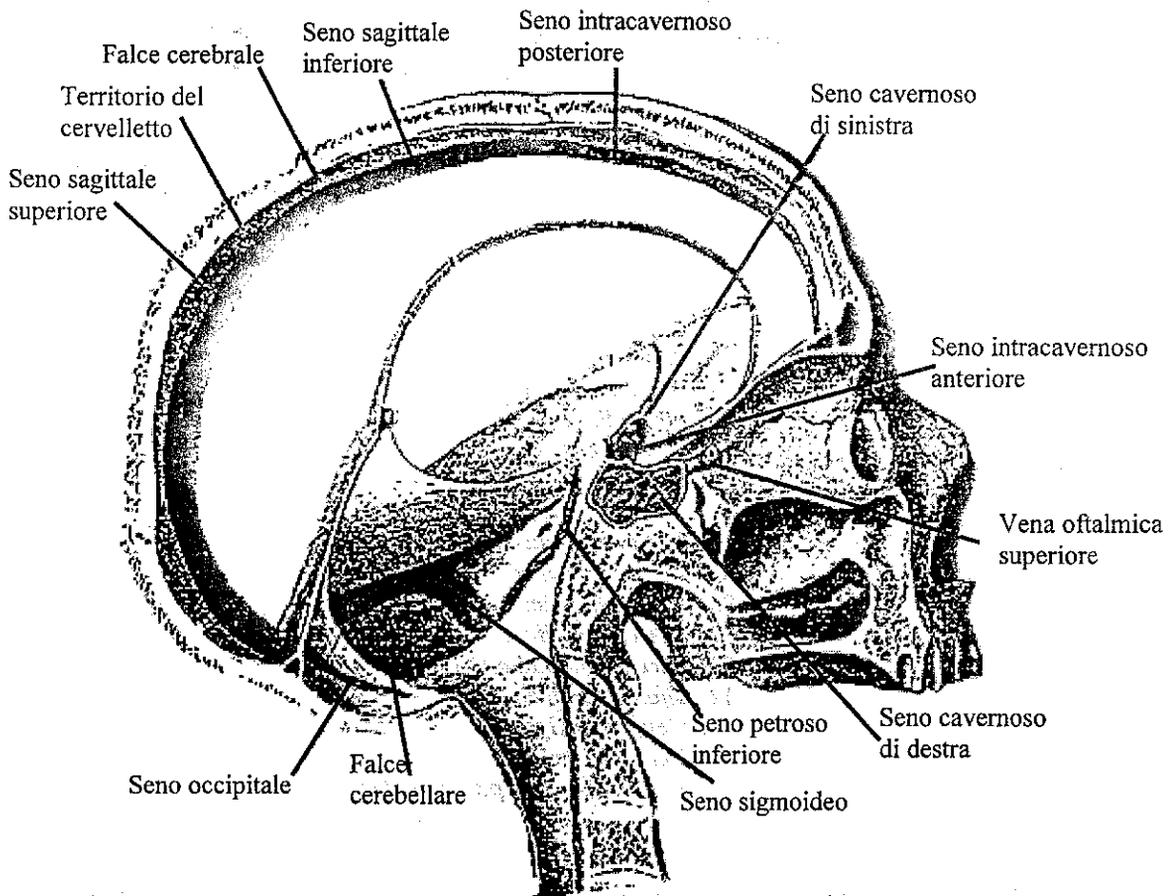
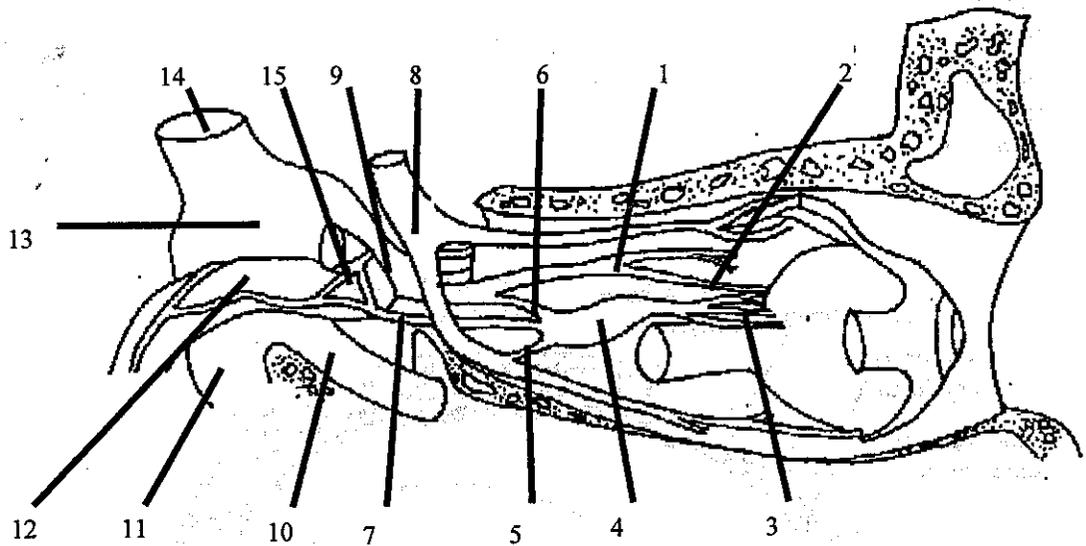


Figura 3.- Sezione sagittale del cranio

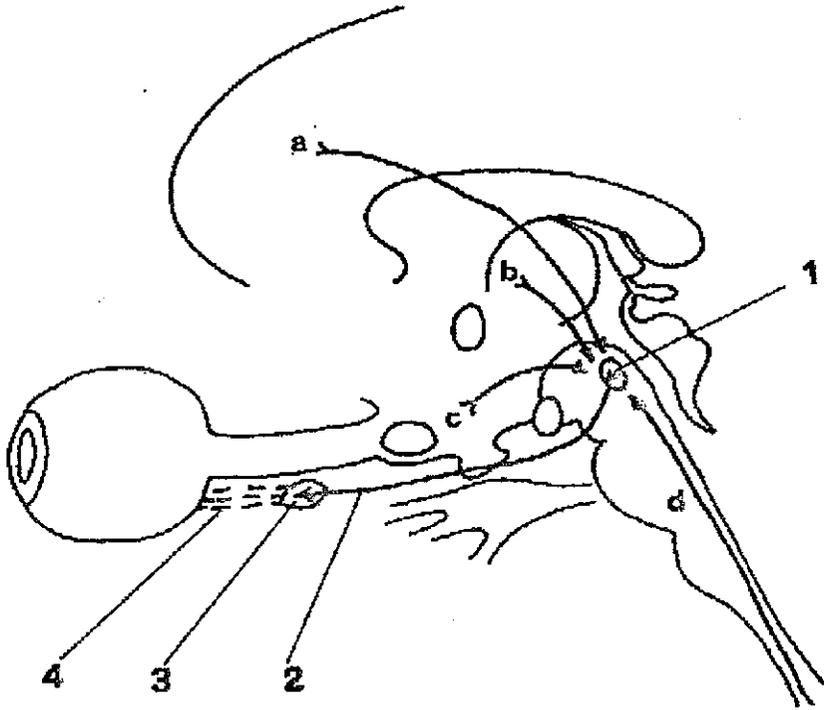
Nel ganglio ciliare la maggior parte dei neuroni sono di tipo parasimpatico, ma sono state riscontrate anche piccole cellule multipolari simpatiche e cellule con funzioni sensitive. Queste fibre attraversano il ganglio senza contrarre pressoché sinapsi; le fibre parasimpatiche contraggono invece sinapsi con i neuroni postgangliari, i quali seguono i nervi ciliari brevi che, in numero di 12-20, penetrano nel globo oculare intorno al nervo ottico (Figura 4).



1. *Ramo nasociliare dell'oftalmico*
2. *Nervo ciliare lungo*
3. *Nervi ciliari brevi*
4. *Ganglio ciliare*
5. *Radice motoria*
6. *Radice sensitiva*
7. *Radice simpatica*
8. *III nervo cranico*
9. *Nervo oftalmico*
10. *Nervo mascellare*
11. *Nervo mandibolare*
12. *Sifone carotideo*
13. *Ganglio di Gasser*
14. *Nervo trigemino*
15. *Plesso simpatico pericarotideo*

Figura 4.- *Disegno schematico illustrante il ganglio ciliare, le sue radici e i nervi ciliari*

Le afferenze ai nuclei di E.-W. costituiscono la prima parte dell'arco riflesso pupillare per quanto riguarda la sua porzione parasimpatica. Esse hanno una triplice origine: provengono dalle vie ottiche (per la regolazione del diametro pupillare in risposta alla variazione della luminosità), dal talamo e dall'ipotalamo (e questo rende conto della midriasi emotiva). Inoltre studi relativamente recenti (2) hanno mostrato l'esistenza di afferenze provenienti dalla sostanza reticolare del tronco cerebrale e dalla corteccia, che sarebbero responsabili della miosi nella visione per vicino (Figura 5).

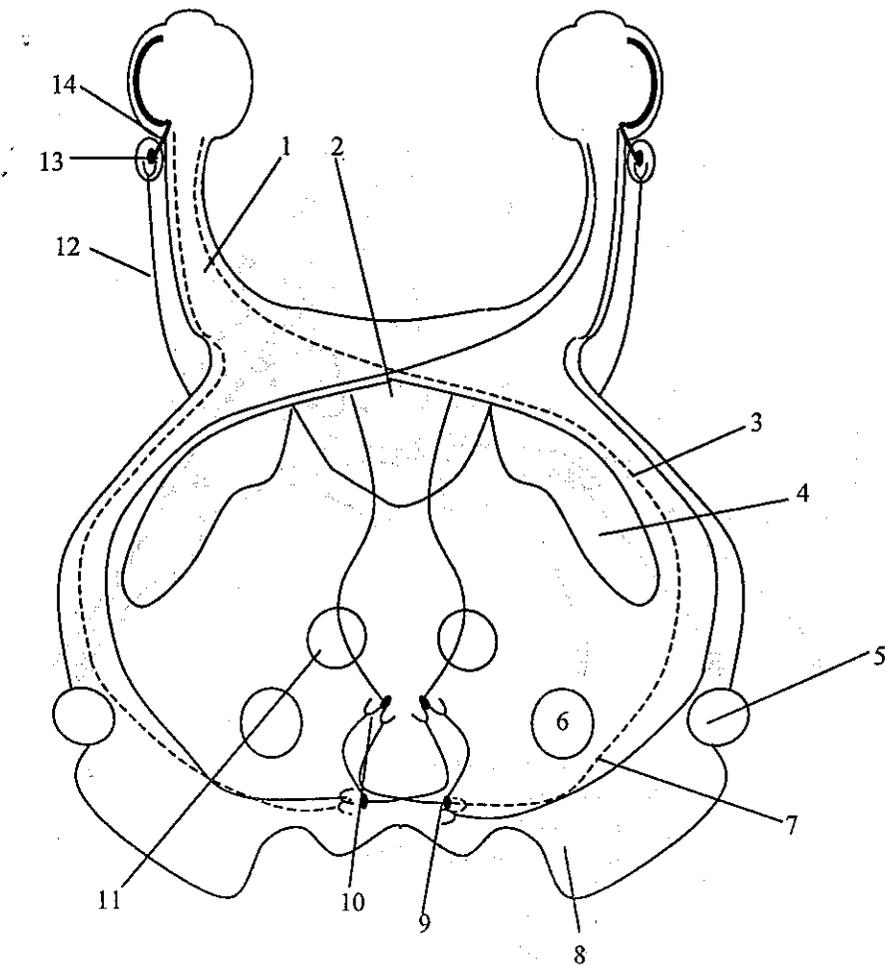


- [a] dalla corteccia celebrale
 [b] dal talamo
 [c] dall'ipotalamo
 [d] dalla sostanza reticolare
 1. nucleo di E-W
 2. III nervo cranico
 3. ganglio ciliare
 4. nervi ciliari brevi.

Figura 5.- Origine degli impulsi inibitori ai nuclei di E-W

Le fibre pupillari provenienti dalle vie ottiche hanno origine dalle cellule gangliari retiniche connesse con i fotorecettori, entrano quindi a far parte del nervo ottico, si incrociano parzialmente nel *chiasma ottico* (Figura 6) e seguono le *bandellette ottiche*, che abbandonano poco prima dei *corpi genicolati laterali*. A questo livello le fibre penetrano in ciascuno dei *bracci congiuntivi superiori* e raggiungono il mesencefalo.

Nel mesencefalo le fibre ottiche contraggono sinapsi con particolari neuroni detti *pretettali*, raggruppati in nuclei omonimi, le cui terminazioni stabiliscono il contatto elettrico con i nuclei di EW. I neuroni pretettali costituiscono dunque l'unione tra il ramo afferente e quello efferente dell'arco per il riflesso fotomotore (Figura 6).



1. *nervo ottico*
2. *chiasma ottico*
3. *bandelletta ottica*
4. *peduncolo cerebrale*
5. *corpo genicolato laterale*
6. *corpo genicolato mediale*
7. *braccio congiuntivo superiore*
8. *pulvinar*
9. *nucleo pretettale*
10. *nucleo di E-W*
11. *nucleo rosso*
12. *III nervo cranico*
13. *ganglio ciliare*
14. *nervi ciliari brevi*

Figura 6.- *Schema dell'arco riflesso fotomotore diretto e consensuale*

Le afferenze responsabili della midriasi emotiva hanno origine invece da neuroni distribuiti in un'estesa area nella porzione dorsale dell'ipotalamo e nel talamo. E' stato dimostrato sperimentalmente che la stimolazione di queste aree provoca midriasi massima anche in condizioni d'interruzione della catena simpatica.

Infine i nuclei di E.-W. ricevono fibre afferenti dalla formazione reticolare del tronco celebrale e da particolari aree della corteccia. A tal riguardo in particolare è stato dimostrato che nel gatto la stimolazione di queste aree provoca effetti parasimpatici pupillari bilaterali (miosi).

1.3 Il sistema simpatico pupillare

Per quanto riguarda la porzione simpatica del sistema di controllo pupillare, i corpi cellulari dei neuroni pregangliari si raggruppano nelle colonne intermedie-laterali del midollo spinale a livello dei segmenti toracici. Tali raggruppamenti (uno per lato) sono detti centri ciliospinali di Budge.

I prolungamenti nervosi dei centri di Budge fuoriescono dal midollo spinale seguendo per un breve tratto il percorso del primo e del secondo nervo dorsale. Presto lo abbandonano per passare nei *rami comunicanti bianchi* (Figura 7) attraverso i quali raggiungono il tratto cervico-toracico della catena gangliare paravertebrale. Vale la pena di osservare come ancora una volta venga rispettata la struttura generale del simpatico, che prevede la presenza di gangli, disposti in catena, prossimi ai centri nervosi e dunque spesso molto distanti dagli organi effettori.

La porzione cervico-toracica della catena gangliare è appoggiata alla prima costa, dietro l'arteria succlavia, ed è coperta da tutte le strutture del collo. Essa è solitamente costituita da una sola struttura: il *ganglio stellato*, che in alcuni soggetti si presenta però bilobato, dando luogo così a due distinte strutture gangliari.

Il tratto cervico-toracico prosegue nella catena gangliare cervicale vera e propria, fino al ganglio cervicale superiore, lungo quasi 2 cm, posto alla base del cranio.

In esso i neuroni pregangliari contraggono sinapsi con quelli postgangliari, che vanno a costituire il *nervo carotico interno* (Figura 7).

Le fibre simpatiche pupillari seguono poi il percorso del nervo oftalmico. Attraverso questo penetrano nella cavità orbitaria e, quando l'oftalmico si apre nei suoi rami terminali, i neuroni simpatici seguono il nervo naso-ciliare ed i nervi ciliari lunghi. Questi ultimi (sensitivi oltre che motori autonomi) perforano in numero di due la sclera, si riuniscono con i nervi ciliari brevi raggiungendo infine l'iride, dove le fibre nervose simpatiche vanno ad innervare il muscolo dilatatore della pupilla.

Dal ganglio cervicale si dipartono anche fibre destinate alla costrizione dei vasi della testa; inoltre il tratto cervicale della catena simpatica provvede all'innervazione pilomotoria delle ghiandole sudoripare e a quella vascolare della cute, della testa, del collo e degli arti superiori.

Le afferenze al centro di Budge hanno origine in un'estesa area dorsale dell'ipotalamo (centro di Karpus e Kreidl). Il decorso delle fibre non è ancora completamente noto, anche se è certo un coinvolgimento del tronco encefalico.

A sua volta l'ipotalamo, per quanto concerne l'attività simpatica oculare, riceve afferenze da alcune parti della corteccia. A tal riguardo è stato dimostrato, mediante sperimentazione su animali, che la stimolazione di quelle zone dell'area frontale connesse con i movimenti oculari estrinseci provoca l'eccitazione del simpatico pupillare con conseguente midriasi, anche se va detto che i risultati sperimentali non si prestano ad una interpretazione univoca, essendosi riscontrate in taluni casi risposte differenti.

1.4 I riflessi pupillari

La risposta neurovegetativa pupillare comprende cinque distinti riflessi:

1) *Il riflesso fotomotore diretto e quello consensuale*: consistono nel restringimento bilaterale delle pupille che si verifica quando si proietta in un occhio luce di sufficiente intensità. Il restringimento della pupilla direttamente interessata costituisce il riflesso diretto, quello dell'altra il riflesso consensuale (o indiretto). Nell'uomo l'intensità di contrazione della pupilla è uguale nei due riflessi, ed è condizionata dallo stato di adattamento retinico e dalla parte di retina che subisce la stimolazione. La latenza del riflesso è di 0.2 secondi in caso di intensa illuminazione, e di 0.5 secondi se lo stimolo è più debole. La contrazione pupillare alla luce, come è stato possibile dimostrare mediante la moderna pupillografia, è costituita da una fase primaria rapida, parasimpatica, e da successive due fasi, più lente dipendenti dal simpatico. Ciò indica che il riflesso fotomotore non è una funzione esclusivamente parasimpatica. Va inoltre menzionato il fatto che ricerche sperimentali condotte sugli animali (gatti) hanno dimostrato la presenza di un controllo superiore celebrale (3).

2) *Il riflesso pupillare per vicino*: consiste nella costrizione bilaterale delle pupille nella visione da vicino, quando cioè si passa dall'osservazione all'infinito all'osservazione a una distanza di 30-40 cm. La miosi è contemporanea all'accomodazione e alla convergenza, ma non dipende né dall'una né dall'altra: è stato infatti osservato che abolendo l'accomodazione mediante lenti sferiche positive, ovvero la convergenza, mediante lenti prismatiche, la miosi si manifesta ugualmente. I tre movimenti sono dunque da considerarsi associati, evocati da un comune stimolo, ma indipendenti. Infine, poiché la miosi da vicino può manifestarsi anche in condizioni patologiche che pregiudicano il riflesso fotomotore (*pupilla di Argyll Robertson*), si è pensato che nel nucleo di EW esistano aree distinte per i due riflessi, oppure che le fibre

del terzo nervo cranico da essi rispettivamente interessate abbiano un percorso diverso, anche se a tutt'oggi tale separazione non è stata individuata.

3) *Il riflesso pupillare all'oscurità*: consiste nella dilatazione pupillare che consegue ad una breve interruzione dell'illuminazione che si era mantenuta costante per un tempo sufficientemente lungo da aver permesso all'occhio di adattarsi. Perché lo stimolo sia evidente è necessario che l'occhio sia adattato ad una luce intensa e che lo stimolo al buio abbia una durata di almeno 0.3 s.

4) *Il riflesso pupillare agli stimoli emotivi e sensoriali*: le emozioni sono provocate da determinati stati d'animo quali i pensieri spontanei e la paura, oppure conseguono a sensazioni quali il dolore. Esse provocano eccitazione del simpatico e inibizione del parasimpatico: a livello pupillare ciò si traduce una midriasi bilaterale che spesso è associata ad un lieve sbarramento delle palpebre. Si tratta di un meccanismo di chiara origine corticale mediato sia dal simpatico cervicale, che attiva il dilatatore della pupilla, sia dal terzo nervo cranico che inibisce il tono dello sfintere pupillare (4).

5) *Il riflesso pupillare alla chiusura delle palpebre*: consiste in una breve costrizione e ridilatazione della pupilla per la chiusura spontanea o intenzionale delle palpebre. Sembrerebbe dipendere da brevi stimoli all'oscurità, conseguenti alla chiusura delle palpebre, e allo stato emotivo del soggetto. Non vengono generalmente considerati tra i riflessi pupillari quello cosiddetto oculosensoriale (o trigeminale) che consiste nella dilatazione pupillare bilaterale, seguita da immediata costrizione, che si verifica quando si stimola la cornea, e la miosi, seguita da midriasi conseguente alla stimolazione acustica mediante un diapason. Queste risposte pupillari sarebbero la risultante di riflessi pupillari a stimoli emotivi e alla chiusura palpebrale.

2. ANALISI DELLE FLUTTUAZIONI DEL DIAMETRO PUPILLARE E SIGNIFICATO CLINICO

I primi studi sulle fluttuazioni spontanee del diametro pupillare in assenza di stimolazioni esterne come la luce o l'accomodazione visiva si devono a Usui e Stark (5). Questi studi non individuarono componenti armoniche specifiche nelle fluttuazioni spontanee del diametro pupillare. Al contrario, Stark introdusse un input stocastico nel modello del controllo della pupilla e concluse che il rumore nella banda di frequenza 0.03-0.5 Hz è la maggiore componente delle fluttuazioni spontanee del diametro pupillare (5). Tuttavia, è generalmente accettato che l'innervazione simpatica e parasimpatica dei muscoli dell'iride svolga un ruolo significativo nella genesi e nella modulazione delle fluttuazioni spontanee della pupilla nell'animale e nell'uomo. In particolare è stata dimostrata prima negli animali (6) e poi nell'uomo (7,8), la presenza di oscillazioni pupillari sincrone con l'attività respiratoria: in generale l'inspirazione ne provoca la dilatazione, l'espiazione ne induce la costrizione (6,7). L'interesse nella ricerca di specifiche componenti armoniche è alimentato dai risultati ottenuti nello studio delle componenti oscillatorie nei segnali di variabilità cardiovascolare (9). La quantificazione mediante analisi nel dominio della frequenza dell'ampiezza delle oscillazioni del ritmo cardiaco ha infatti permesso una migliore comprensione della fisiologia del controllo autonomo cardiovascolare e l'individuazione di indici quantitativi per la valutazione del bilanciamento simpato-vagale. Il ritmo respiratorio, presente in varie fibre nervose simpatiche e parasimpatiche e nel segnale di variabilità della frequenza cardiaca (9), è indicato come componente in alta frequenza (High Frequency, HF, 0.15-0.4 Hz), è considerato un indice del controllo parasimpatico sul nodo del seno. Nel segnale di variabilità della frequenza cardiaca è individuabile anche un'altra componente, nella cosiddetta banda in bassa frequenza (Low Frequency, LF, 0.04-0.15 Hz). Una dettagliata esposizione di questo argomento è riportata in (9).

Risale al 1978 il primo studio mirato ad analizzare la funzione pupillare in soggetti diabetici con neuropatia autonoma (10). Si dimostrò che i diabetici neuropatici avevano un diametro pupillare minore dei soggetti di controllo, e che la risposta a riflessi di luce era ridotta in ampiezza. Inoltre, le oscillazioni del diametro pupillare in presenza di luce costante erano minori nei diabetici rispetto ai normali, anche se la distribuzione delle oscillazioni nel range di frequenza analizzato (0-2.0 Hz) risultava identica.

Recentemente Yoshida *et al.*, mediante l'acquisizione simultanea della pupilla e dell'attività respiratoria, ha individuato fluttuazioni del diametro pupillare sincrone con l'attività respiratoria (8). Lo stesso gruppo, mediante analisi cross-spettrale delle fluttuazioni del diametro pupillare e della variabilità della frequenza cardiaca, ha evidenziato un legame tra i ritmi della variabilità cardiovascolare e quelli della pupilla (11).

Recenti studi hanno inoltre dimostrato come le componenti spettrali LF delle fluttuazioni del diametro pupillare aumentino durante uno sforzo mentale (12) e durante attivazione simpatica mediante head-up TILT test (13).

3. PUPILLOMETRIA E PUPILLOGRAFIA

Lo studio delle fluttuazioni spontanee o indotte del diametro pupillare come indicatori dell'attività neurovegetativa, dell'integrità dei riflessi e del sistema visivo, obbliga a porre il problema della pupillografia, cioè dell'analisi delle variazioni nel tempo delle oscillazioni pupillari, da un punto di vista nuovo. Sono infatti molte le problematiche connesse ad una corretta valutazione delle reazioni pupillari, che rendono molte delle più diffuse soluzioni proposte in letteratura o presenti nella pratica clinica inadatte o fortemente sconsigliabili.

I limiti fondamentali della pupillometria sono diversi e tutti essenzialmente dipendenti dalle caratteristiche della pupilla sotto osservazione. Buona parte dei metodi ad esempio, e certamente la grandissima maggioranza di quelli comunemente usati in sede di esame clinico, prevedono una misura statica dell'ampiezza dall'apertura pupillare. Una tale misura è fortemente penalizzata dalla continua fluttuazione della grandezza misurata. Il diametro pupillare, come osservato in precedenza infatti, è l'espressione di un particolare equilibrio neuromuscolare, che si modifica continuamente nel tempo e che è causa di irregolari variazioni del suo diametro. Inoltre tali variazioni non riguardano soltanto l'ampiezza della pupilla, ma anche la sua forma, essendo talvolta localizzate in settori del margine interno dell'iride. A tal riguardo occorre mettere in evidenza come quasi tutti i metodi pupillometrici utilizzati partano dall'assunzione di perfetta circolarità della pupilla. Si tratta in effetti di un'ipotesi accettabile con un buon grado di approssimazione, anche se va ricordato che essa a rigore non è esatta: la pupilla in realtà non è riconducibile ad una forma geometrica semplice, e questa sua caratteristica può occasionalmente essere particolarmente pronunciata (inficiando così la misura) in particolari soggetti. Altra difficoltà a cui vanno incontro buona parte dei metodi di misura impiegati è la poco chiara delimitazione del margine pupillare a causa del basso contrasto che presenta con il bordo interno dell'iride. Paradossalmente questa difficoltà è comune sia ai più rudimentali metodi pupillometrici, basati sull'osservazione diretta, che a quelli più sofisticati che fanno uso di tecniche di elaborazione delle immagini.

Infine occorre evidenziare un problema che sorge quando si vuole fornire una misurazione accurata delle dimensioni pupillari. Esso deriva dal fatto che la pupilla osservata appare ingrandita rispetto alle sue dimensioni reali. Questo ingrandimento ottico è dovuto al diotro presente davanti al foro pupillare composto dall'umor acqueo, dalla cornea e dal mezzo ambientale (aria). La modellistica oftalmologica ha permesso di calcolare approssimativamente quest'aberrazione che è stata quantitativamente espressa da un coefficiente di ingrandimento pari a 1,1333. In realtà questo errore viene quasi sempre trascurato anche in considerazione del fatto che in una indagine pupillometrica quello che interessa sono solitamente le variazioni relative del diametro pupillare, essendo il suo valore assoluto una caratteristica in larga misura variabile da soggetto a soggetto e di scarso contenuto informativo.

I metodi di misurazione della pupilla si dividono essenzialmente in metodi di confronto e metodi fotografici. I primi a loro volta si dividono ulteriormente in metodi di confronto diretto, tangenziale e a proiezione.

- *Confronto diretto.* In questo metodo si confronta l'ampiezza pupillare con una serie di dischi o fori di diametro crescente (pupillometro di Morton), il confronto può anche essere effettuato in trasparenza facendo uso di una sottile lastra di vetro che viene posta davanti all'occhio del paziente (pupillometro di Schloesser).

a) *Confronto tangenziale.* Si tratta di un metodo generalmente considerato più accurato. Vengono fatte passare tangenzialmente alla circonferenza pupillare delle linee parallele il cui scartamento fornisce la misura voluta.

b) *Confronto a proiezione.* A differenza degli altri metodi di confronto la misura non viene effettuata direttamente sulla pupilla, ma su una sua immagine proiettata per mezzo di vari apparati ottici (alcuni dei quali molto ingegnosi) su una scala graduata.

- *Metodi fotografici.* I pupillometri fotografici permettono la misurazione del diametro della pupilla su una sua immagine fotografica facendo uso di pellicole all'infrarosso. L'introduzione negli studi pupillometrici della luce alle frequenze dell'infrarosso, largamente impiegata in queste applicazioni fin dagli anni trenta, si giustifica con la necessità di ottenere una adeguata illuminazione dell'occhio nelle riprese fotografiche senza con ciò stimolare il riflesso fotomotore. In realtà, vedremo più avanti, questo non è il solo vantaggio che essa presenta.

La progressiva introduzione di tecniche fotografiche, cinematografiche ed infine elettroniche ha portato alla nascita di un ben più completo metodo di studio della pupilla che prende il nome di *pupillografia*.

I metodi pupillometrici fin qui esaminati, che restano i più utilizzati in ambito clinico, effettuano tutti una misura statica dell'ampiezza del forame pupillare. La pupillografia è invece in grado di fornire un vero e proprio tracciato (*pupillografico*) che evidenzia, in dipendenza del tempo, l'andamento dell'ampiezza pupillare.

La metodica pupillografica più usata consiste nel registrare un flusso di raggi infrarossi riflessi dall'occhio, sfruttando la caratteristica della pupilla di avere una riflessione molto minore rispetto alle altre parti visibili dell'occhio (iride e sclera). La quantità di radiazione riflessa complessivamente avrà dunque una componente proporzionale, istante per istante, all'ampiezza della pupilla. L'accusa principale mossa a questo metodo di misurazione è che la calibrazione dipende fortemente dal soggetto su cui si effettua la misura. Ciò è causato dal fatto che iridi diverse presentano in funzione del loro colore una diversa capacità di riflettere gli infrarossi (maggiore nei soggetti con gli occhi scuri ad esempio rispetto ai soggetti con gli occhi chiari), e ciò si traduce in un artefatto che modifica le dimensioni apparenti della pupilla.

In ambiti di ricerca la pupillografia è stata recentemente associata a tecniche di inseguimento ed individuazione della posizione della pupilla nell'orbita oculare, e sono stati realizzati apparati in grado di fornire istante per istante posizione e dimensioni della pupilla. Buona parte di questi metodi è basata su algoritmi di elaborazione analogica delle immagini, incapaci tuttavia di risolvere movimenti oculari inferiori a 0.2 gradi o con una dinamica superiore ai 100 Hz (movimenti saccadici). Una metodica particolarmente diffusa consiste ad esempio nel porre una soglia sulla componente di

luminanza del segnale video per individuare nell'immagine l'occorrenza del bordo pupillare; ovvia critica a questo metodo è la sua alta sensibilità al rumore che suggerirebbe invece un criterio di misura basato su una stima dell'area; si segnala a tal riguardo il pupillografo realizzato nel 1991 all'università dello Iowa che, pur partendo dall'elaborazione del segnale analogico, consente una valutazione piuttosto accurata del diametro pupillare attraverso la stima della superficie del foro (14).

Altre soluzioni infine fanno uso delle diverse proprietà di riflessione dell'iride e della sclera: illuminando con luce all'infrarosso il confine tra di esse e misurando la quantità di luce riflessa è possibile un'accurata misurazione dell'angolo di rotazione dell'occhio.

4. PROGETTO E REALIZZAZIONE DI UN SISTEMA PUPILLOGRAFICO INNOVATIVO

Uno studio pupillografico è generalmente rivolto all'analisi di caratteristiche del comportamento volontario (saccadi di puntamento, inseguimento di oggetti ecc.) e della risposta pupillare ad uno stimolo esterno, che si realizza a pochi secondi dall'applicazione dello stimolo. Le apparecchiature e gli strumenti esistenti sono spesso piuttosto scomodi, in quanto prevedono sempre il bloccaggio del capo e del mento del paziente, e molto spesso lo costringono a tenere le palpebre aperte. L'impiego di una tecnica diversa che permetta innanzitutto un'acquisizione piuttosto lunga (almeno qualche decina di minuti) in condizioni di massimo "comfort" per il paziente è quindi importante. Questo deve poter stare sdraiato su un lettino e deve essergli consentito di muovere liberamente il capo e gli occhi, anche se gli si potrà naturalmente chiedere di guardare un oggetto posto davanti a sé.

4.1 Acquisizione dell'immagine pupillare

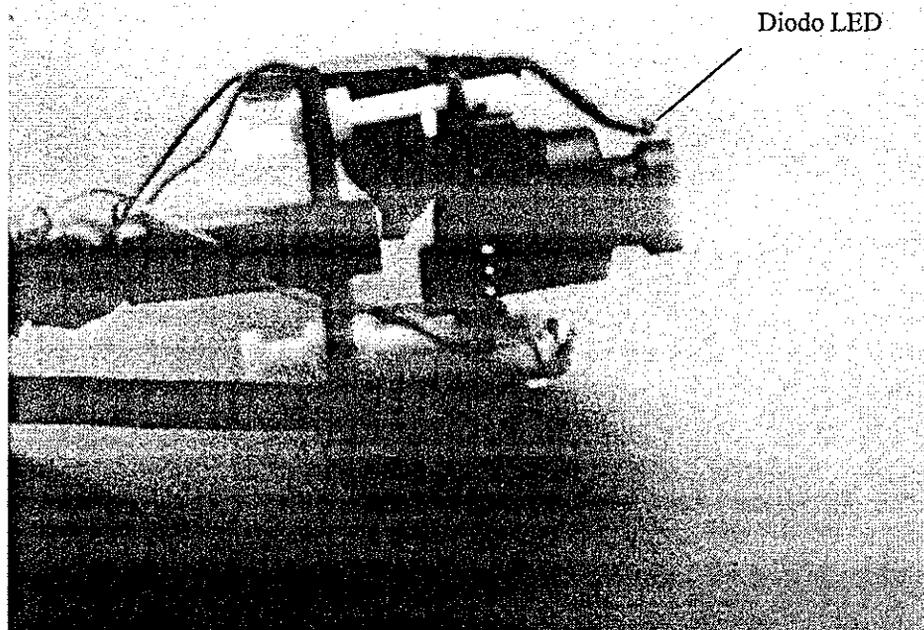
Il sistema pupillografico realizzato prevede la digitalizzazione del segnale video relativo all'occhio, ripreso da una microtelecamera ad infrarossi (4x4x3 cm, 35 g, Figura 8) montata su un leggero caschetto solidale con il capo (Figura 9).

La telecamera è montata rigidamente al caschetto per mezzo di supporto snodabile che le permette di puntare uno degli occhi del paziente. Lo snodo consente un ampio margine di movimento prima del fissaggio, molto utile per una preliminare ottimizzazione dell'inquadratura e delle condizioni di messa a fuoco. La forma del capo e la posizione degli occhi presentano infatti delle piccole variazioni da soggetto a soggetto. La telecamera è collegata con un convertitore A/D di tipo commerciale, installato su PC. Lo schema del sistema è mostrato in Figura 10.

La distanza finale che viene raggiunta tra l'obbiettivo e la cornea varia leggermente da paziente a paziente, ma comunque non supera mai i 2-3 centimetri. Questo allo scopo di evitare l'accomodazione visiva sulla telecamera ed il riflesso pupillare ad essa associato. D'altra parte avere un oggetto così vicino all'occhio potrebbe costituire motivo di disagio per il paziente. Per ovviare a questo inconveniente è bene far precedere l'acquisizione vera e propria delle immagini da un periodo di tempo di qualche minuto, tale da permettere al paziente di abituarsi alla presenza del caschetto e della telecamera (oltre che agli altri strumenti di acquisizione).

Le riprese vengono effettuate con una illuminazione agli infrarossi (780 nm), assicurata da un diodo LED, posizionato sul bordo esterno dell'obbiettivo (Figura 8). Il diodo illumina la pupilla emettendo una densità di potenza di circa 4 mW/sr, la potenza incidente sulla cornea del paziente essendo al di sotto dei limiti posti sulla esposizione

dei lavoratori agli agenti fisici dall'ACGIH (American Conference of Governmental Industrial Hygienists).



*Figura 8.- Microtelecamera analogica ad infrarossi (4x4x3 cm, 35 g),
e diodo LED che consente l'illuminazione agli infrarossi (780 nm),
posizionato sul bordo esterno dell'obiettivo*

L'impiego della luce nel campo infrarosso (diffusamente utilizzata in oculistica a partire dagli anni trenta), oltre al vantaggio ovvio di non indurre il riflesso pupillare fotomotore, ha la caratteristica di rendere la pupilla particolarmente definita nell'immagine, indipendentemente dal colore dell'iride. Questo è dovuto alle caratteristiche di riflessione del tessuto irideo, e consente di utilizzare immagini in bianco e nero, con un sostanziale risparmio di costo della telecamera nonché di memoria magnetica necessaria per l'acquisizione. In effetti l'impiego di immagini a colori, molto utile per una corretta definizione del contorno pupillare in luce normale, e particolarmente per soggetti con gli occhi scuri, diventa del tutto superfluo in queste condizioni di illuminazione.

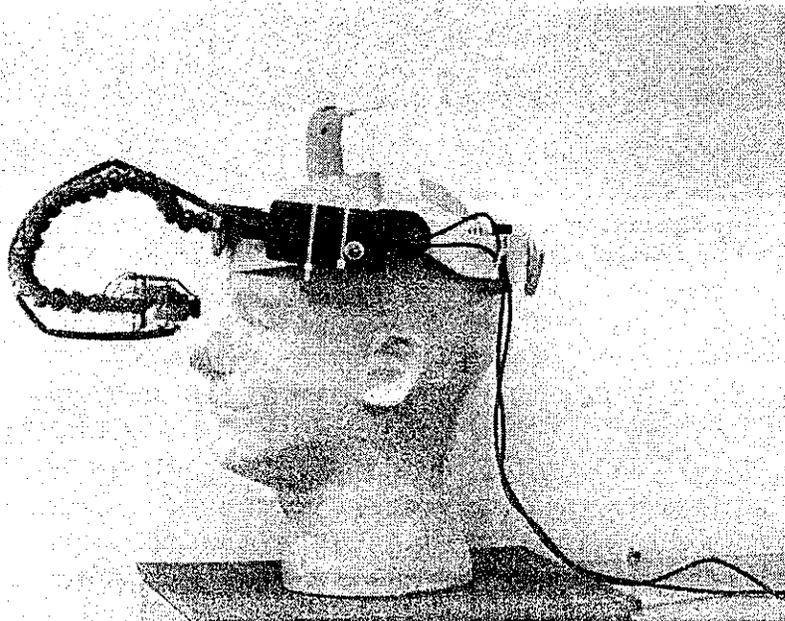
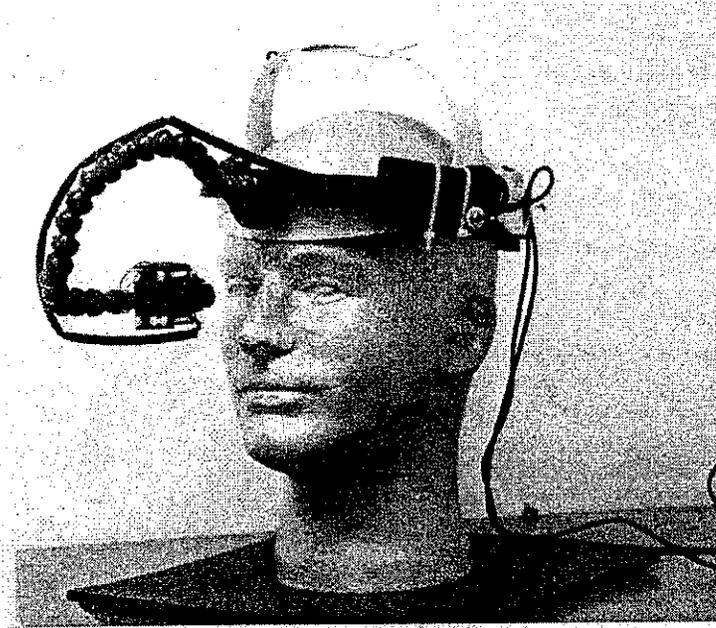


Figura 9.- Caschetto su cui la telecamera è montata rigidamente per mezzo di supporto snodabile che le permette di puntare uno degli occhi del paziente

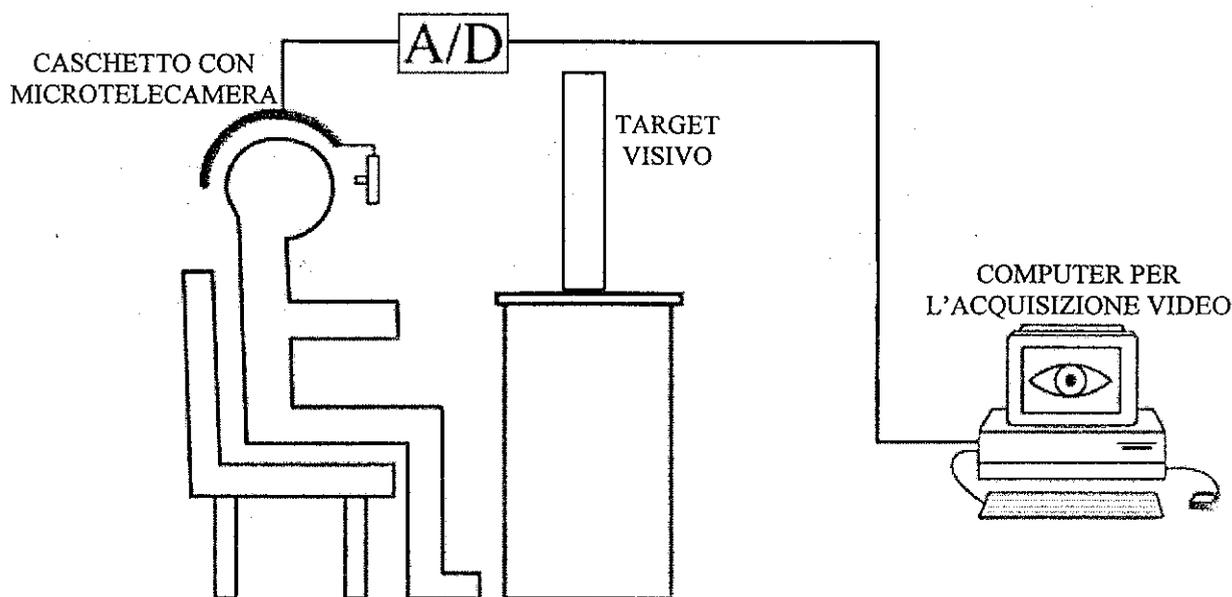


Figura 10.- Rappresentazione schematica del sistema pupillografico.

La ripresa dell'immagine pupillare effettuata con queste modalità permette tutti i movimenti del capo. Analogamente la scelta dell'analisi automatica previa digitalizzazione del segnale permette l'applicazione di algoritmi di inseguimento della pupilla, il che si traduce nell'ulteriore possibilità per il paziente di compiere movimenti oculari (non essendoci costrizione a tenere lo sguardo fisso).

L'elaborazione delle immagini della pupilla effettuata off-line permette di esercitare un controllo sull'apertura della palpebra e quindi di scartare i dati campionati eventualmente presi in occasione di una sua chiusura. In questo caso i dati mancanti relativi alla stima del diametro pupillare vengono ottenuti operando un'opportuna interpolazione. Infine la disponibilità del segnale digitalizzato relativo all'intero periodo di acquisizione, e la possibilità di stabilire l'istante iniziale a partire dal quale si debba iniziare l'elaborazione e debbano essere forniti i valori pupillometrici, permette di ottemperare alle esigenze di sincronizzazione imposte da un'acquisizione multipla.

Il convertitore analogico digitale da utilizzarsi in questo schema di misura deve accettare in ingresso il segnale analogico televisivo (ovviamente in banda base e conforme allo standard europeo PAL) e convertirlo in digitale. Lo standard PAL (ed altri standard di codifica analogica del segnale video) prevede la rappresentazione del segnale televisivo a 625 righe e con una frequenza di semiquadro di 50 Hz. L'immagine da riprendere è composta da 2 semiquadri successivi; vengono quindi resi disponibili 25 frame/secondo. Il convertitore analogico digitale utilizzato nel sistema pupillografico ha

una frequenza di campionamento di 25 frame/secondo e permette una risoluzione di 576x768 pixels.

L'acquisizione simultanea di immagini pupillari e di eventuali altre variabili di interesse fisiologico e/o di segnali di stimolo visivo richiede l'utilizzo di un appropriato circuito di sincronizzazione. Tale necessità origina dalle peculiari caratteristiche poste dallo standard televisivo analogico. Le singole immagini pupillari sono infatti disponibili ad istanti discreti (40 ms nello standard PAL), mentre generalmente le altre variabili di interesse sono di tipo analogico e quindi continue del tempo (ECG, EEG ecc...). Sono dunque questi ultimi segnali a dover essere acquisiti in modo sincrono con i frame video. Ciò è possibile utilizzando il segnale di sincronismo video disponibile nello standard PAL. In questo modo si riesce a sincronizzare l'inizio della conversione analogico-digitale dei segnali con la generazione dei frame video.

In particolare il convertitore A/D video utilizzato rende disponibile in uscita il segnale di sincronismo di frame. In Figura 11 è rappresentato il diagramma a blocchi implementato in ambiente LabView per acquisire il segnale video e generare il segnale di sincronismo di frame.

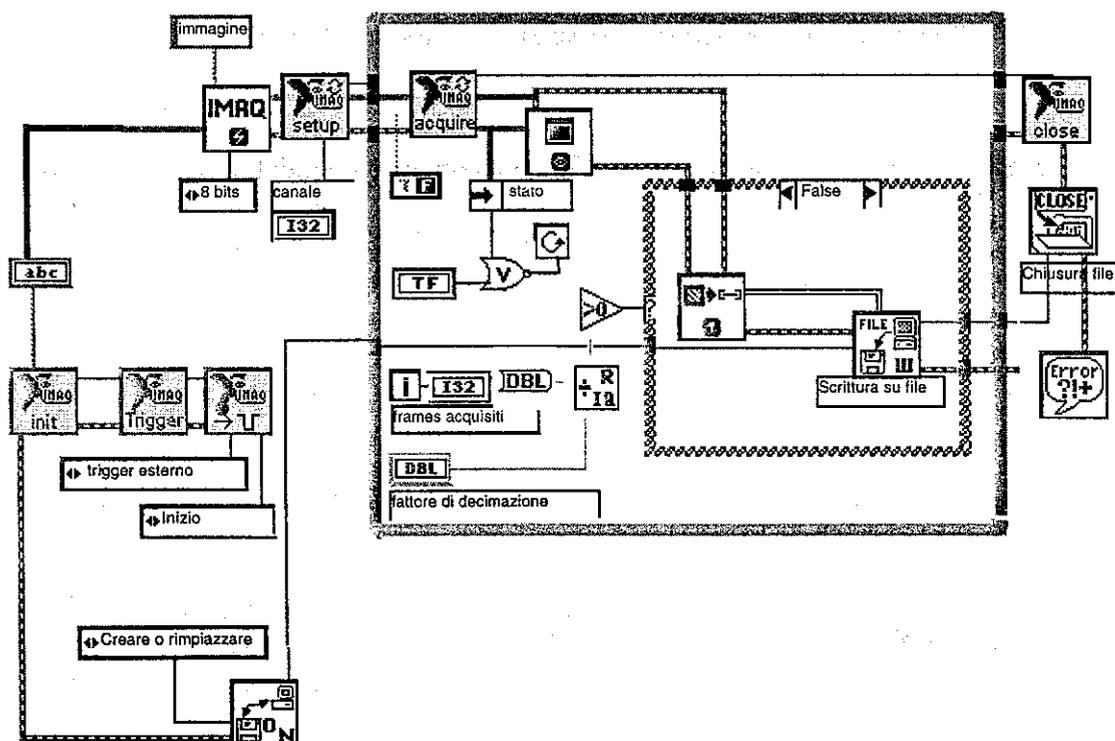


Figura 11.- Diagramma a blocchi in ambiente Labview per la configurazione della scheda video, per l'acquisizione del segnale video e per la configurazione del sincronismo di frame.

4.2 Calibrazione del pupillometro

L'utilizzo di una microtelecamera solidale alla testa del soggetto e la necessità di adattare la distanza della telecamera dall'occhio al fine di ottenere una ottimale ripresa implica un processo di calibrazione da effettuarsi all'inizio di ogni esame.

A tale scopo è stata implementata una procedura di calibrazione mediante una ripresa di una circonferenza di diametro noto posta sulla palpebra del soggetto (Figura 12). Tale procedura permette la stima dell'ingrandimento ottico introdotto dal sistema di ripresa, consentendo quindi la calibrazione del sistema.

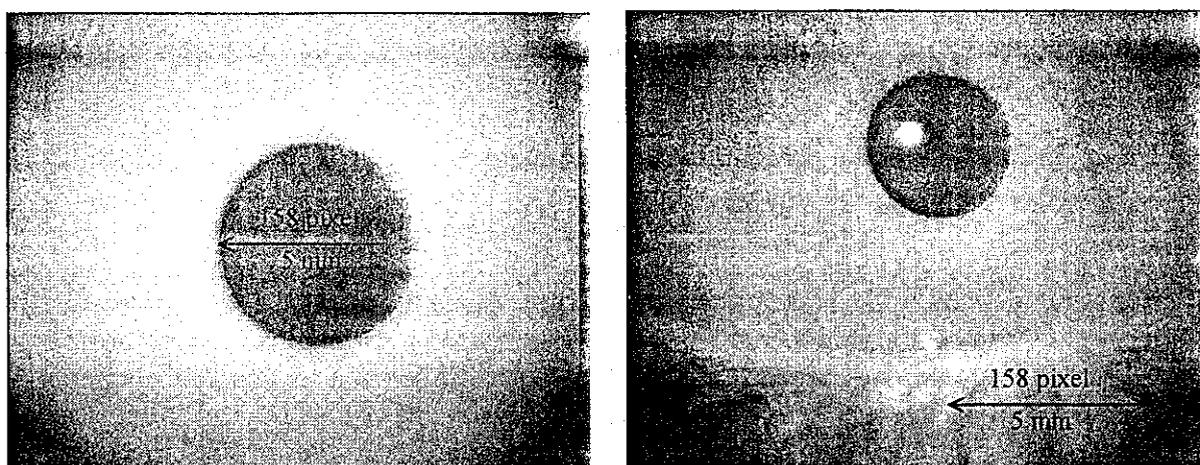


Figura 12.- Calibrazione del pupillometro mediante la ripresa di circonferenze di diametro noto (pannello sinistro) poste sulla palpebra del soggetto

4.3 Algoritmo di riconoscimento e misura del diametro pupillare

Al fine di estrarre serie temporali che rappresentino le fluttuazioni del diametro pupillare sono necessari algoritmi di misura delle dimensioni pupillari a partire dalla rappresentazione numerica di un singolo frame. Tale misura è ripetuta su tutti i frame della ripresa video, e fornisce l'andamento temporale del segnale pupillare, cioè il tracciato pupillografico che verrà successivamente campionato in maniera opportuna.

4.3.1 Algoritmo di riconoscimento

La prima cosa di cui bisogna accertarsi prima di individuare la posizione pupillare è che la pupilla sia ben visibile nell'immagine. Potremmo infatti avere

incidentalmente a che fare con un frame durante il quale il paziente ha sbattuto le palpebre e la pupilla potrebbe essere del tutto o parzialmente coperta. Per ovviare a questo inconveniente, l'algoritmo di analisi automatica prevede un semplice conteggio preliminare dei pixel a bassa luminanza (rispetto ad un'opportuna soglia). Grazie all'illuminazione fornita dai LED all'infrarosso, l'immagine si presenta generalmente piuttosto luminosa fatta eccezione per la Figura molto scura della pupilla che è così facilmente individuabile con un'opportuna soglia sulla luminanza dei pixel.

Accertata la presenza della pupilla, si può procedere all'individuazione della sua posizione, che per noi sarà una valutazione approssimativa delle coordinate del suo centro. La tecnica utilizzata a questo scopo è piuttosto semplice ma anche sorprendentemente efficace (13). Prevede la ricerca del baricentro dell'immagine, intendendo per baricentro il punto che minimizza la somma delle distanze dai pixel sotto soglia, cioè dai pixel verosimilmente appartenenti alla pupilla. In pratica però una semplice valutazione del baricentro conduce spesso a risultati grossolanamente sbagliati, e questo per due ordini di motivi. Innanzitutto se è vero che una soglia sulla luminanza permette di discriminare principalmente i pixel che rappresentano la pupilla, è d'altra parte inevitabile che nell'immagine esistano altre zone sufficientemente scure da capitare sotto soglia, prevalentemente situate ai bordi, e dovute ad esempio ad una scarsa illuminazione, alle ciglia o ad un effetto di ombra causato dalla palpebra.

Per ovviare al primo degli inconvenienti citati si è utilizzato un algoritmo iterativo che calcola il baricentro non dell'intera immagine, ma di una sua porzione rettangolare, di dimensioni opportune fissate una volta per tutte all'inizio del procedimento di misura ($N \times M$). Queste dimensioni devono essere le minime che ancora assicurano di essere maggiori delle massime dimensioni verosimilmente raggiungibili dalla pupilla durante l'acquisizione. È chiaro come questa valutazione debba essere fatta al momento di cominciare ogni acquisizione tenendo conto delle dimensioni che la pupilla, per quel soggetto e in quelle particolari condizioni di ripresa, assume nell'immagine. In particolare la prima immagine (I_0) su cui si calcola il baricentro è di 376×568 pixel, centrata attorno all'immagine iniziale, come mostrato in Figura 13.

L'algoritmo viene inizializzato ponendo come baricentro iniziale il baricentro dell'immagine I_0 (x_0, y_0). Successivamente si calcola il baricentro (x_1, y_1) del rettangolo $N \times M$ con centro in (x_0, y_0). Si calcola poi nuovamente il baricentro (x_2, y_2) di un rettangolo $N \times M$ centrato nel baricentro (x_1, y_1). Ogni volta che si ottiene una nuova coppia di punti se ne valuta la distanza con la precedente; il procedimento iterativo si arresta all'annullarsi di tale distanza (o meglio quando questa distanza è minore di 2 pixel).

L'algoritmo appena descritto permette di non considerare i pixel prossimi ai bordi dell'immagine che eventualmente si trovassero ad essere sotto soglia e che renderebbero imprecisa la valutazione del baricentro. Esso non ha mai mostrato problemi di convergenza, a patto che il primo rettangolo (I_0) del quale si calcola il baricentro contenga già una parte della pupilla, condizione questa facilmente realizzabile per mezzo di un'opportuna illuminazione associata ad un'adequata scelta dei valori N ed M .

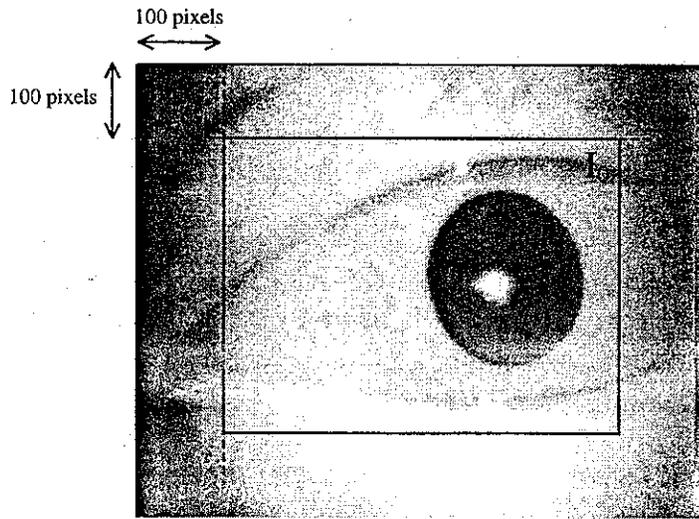


Figura 13.- *Porzione rettangolare iniziale (I_0) per l'algoritmo iterativo di ricerca del baricentro*

Nel caso ideale di immagine costituita da un cerchio completamente nero, anche se fortemente disturbata ai bordi, il procedimento converge dopo al più quattro o cinque iterazioni (Figura 14).

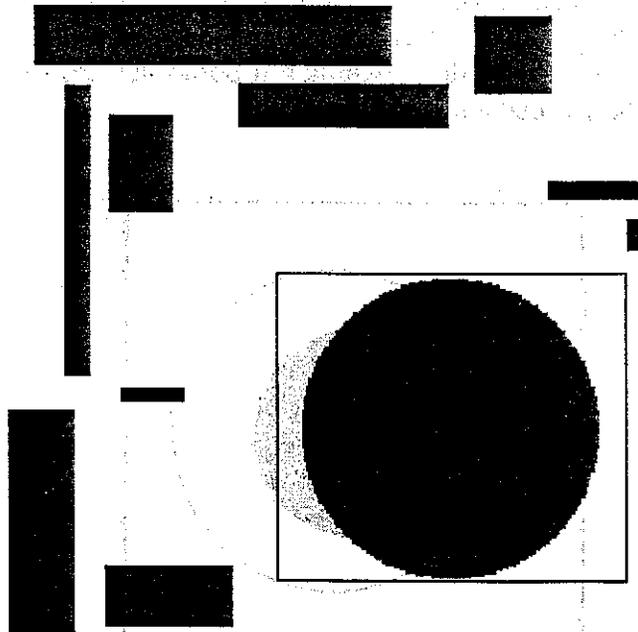


Figura 14.- *Esempio di applicazione dell'algoritmo di individuazione del centro pupillare su una schematizzazione della pupilla.*

In realtà, come abbiamo osservato, la situazione reale, a causa della luce all'infrarosso proveniente dai LED riflessa dalla sclera si avvicina al caso mostrato in maniera molto enfatizzata in Figura 15. Nei casi reali dunque il valore ottenuto come centro della pupilla, costituisce solo una sua approssimazione, tanto migliore quanto minore è il rapporto tra il numero di pixel sopra soglia del riflesso dei diodi e l'area della pupilla.

Questa mancanza di accuratezza è però ai nostri fini del tutto accettabile: in questa fase non si è infatti interessati all'individuazione esatta della posizione della pupilla nell'immagine, ma è sufficiente che la pupilla sia con certezza contenuta nella porzione dell'immagine determinata dal rettangolo con centro in (x_n, y_n) , risultante dal procedimento iterativo descritto.

I risultati dell'algoritmo di individuazione del baricentro dell'immagine è mostrato per un caso reale nella Figura 16. L'effetto del riflesso del diodo ad infrarossi enfatizzato in Figura 14 è nei casi reali praticamente trascurabile anche ai fini di una corretta individuazione.

Può infine accadere che la pupilla risulti parzialmente nascosta non già dalla palpebra, ma dal fatto che una ampia rotazione del bulbo oculare ha portato la pupilla fuori immagine. Questa in realtà è una condizione che in generale non dovrebbe verificarsi: la ripresa deve essere fatta in modo tale da comprendere nel campo visivo della telecamera tutta l'orbita oculare. Nonostante ciò, può succedere che per determinati pazienti, a causa di particolari caratteristiche fisionomiche, vengano tagliate fuori dall'immagine le parti più esterne dell'orbita. In questi casi un controllo della distanza tra il centro individuato della pupilla e il bordo dell'immagine impedisce una misura che risulterebbe inaccettabile.

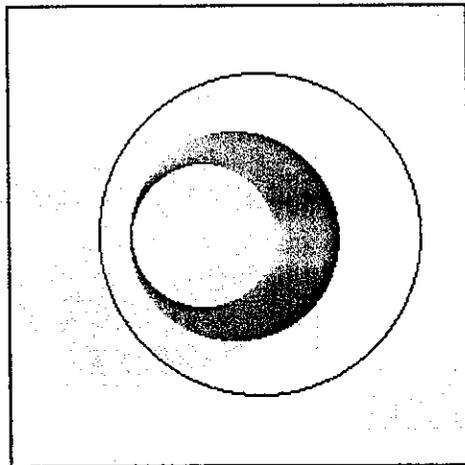


Figura 15.- *Convergenza non accurata dovuta alla presenza di un artefatto luminoso all'interno della pupilla.*

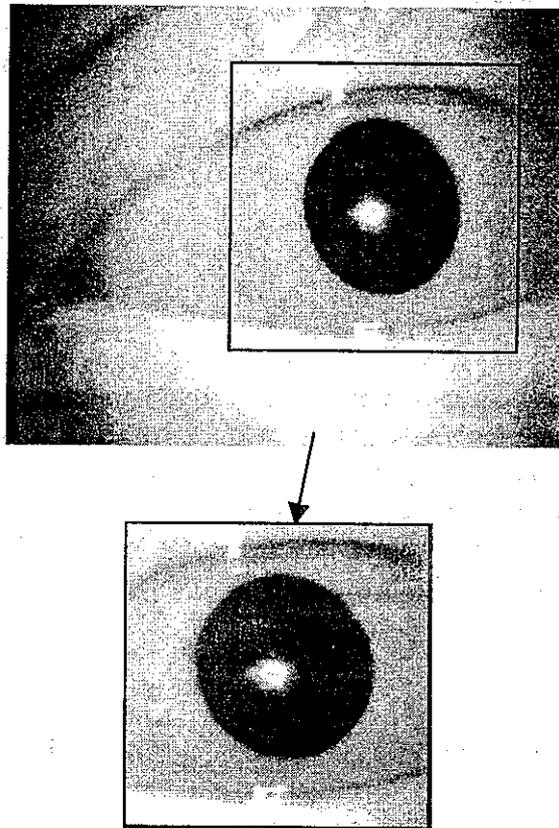


Figura 16- *Pannello superiore: immagine pupillare con pupilla decentrata e riflesso del diodo ad infrarossi. Pannello inferiore: porzione rettangolare su cui opera l'algoritmo di misura del diametro pupillare*

Individuata la posizione della pupilla, l'algoritmo di riconoscimento e misura del diametro pupillare utilizzato in questo lavoro, parte dall'assunzione che la pupilla sia di forma perfettamente circolare, e che la sua immagine video sia ottenuta in maniera tale da mantenere questa sua caratteristica. In altre parole si assume che le aberrazioni ottiche introdotte dal diotro della telecamera possano essere considerate trascurabili e che l'angolo sotto il quale viene effettuata la ripresa sia sufficientemente piccolo da non causare una deformazione prospettica della pupilla.

4.3.2 Algoritmo di misura

Il procedimento di individuazione della pupilla nell'immagine descritto nel paragrafo precedente si conclude con la definizione di una zona dell'immagine di forma rettangolare al cui interno è contenuta la pupilla. In generale la pupilla non sarà

perfettamente concentrica rispetto a tale zona, occupando una posizione che potrà essere di volta in volta più o meno eccentrica. Si pone dunque il problema di come effettuare in maniera rapida e sufficientemente precisa, a partire da queste condizioni, la misura del diametro della pupilla.

L'algoritmo prevede innanzitutto il filtraggio dell'immagine per il rilevamento dei contorni (edge detection, Figura 17 pannello B); i punti che indicano i contorni dell'immagine vengono ulteriormente filtrati al fine di estrarre solo i punti verosimilmente appartenenti al bordo pupillare (Figura 17 pannello C).

Viene allora eseguita iterativamente una interpolazione circonferenziale ai minimi quadrati pesati fra tutti i punti trovati (16). Alla prima iterazione il peso assegnato a tutti i punti è unitario. Dalla seconda iterazione in poi viene stimata la varianza dei punti rispetto al cerchio interpolante calcolato nell'iterazione precedente. Il procedimento scarta così iterazione dopo iterazione i punti che distano dal cerchio calcolato nell'iterazione precedente più del doppio della deviazione standard attuale, e attribuisce un peso inversamente proporzionale alla distanza da tale cerchio provvisorio a tutti gli altri. Il calcolo del cerchio approssimante viene per ogni iterazione eseguito minimizzando l'errore quadratico medio J , definito come :

$$J = \sum w_i [(x_i - x_0)^2 + (y_i - y_0)^2 - R^2]^2,$$

il che porta alle espressioni delle coordinate del centro e del raggio (17):

$$x_0 = \frac{B_y C_x - B_x C_y}{A_x B_y - A_y B_x},$$

$$y_0 = \frac{A_y C_x - A_x C_y}{A_y B_x - A_x B_y},$$

$$R^2 = \frac{1}{W} \sum w_i [(x_i - x_0)^2 + (y_i - y_0)^2],$$

dove :

$$W = \sum w_i, \quad \bar{x} = \frac{1}{W} \sum w_i x_i, \quad \bar{y} = \frac{1}{W} \sum w_i y_i,$$

$$A_x = \sum w_i (x_i - \bar{x}) x_i, \quad B_x = \sum w_i (x_i - \bar{x}) y_i,$$

$$A_y = \sum w_i (y_i - \bar{y}) x_i, \quad B_y = \sum w_i (y_i - \bar{y}) y_i,$$

$$C_x = \frac{1}{2} \sum w_i (x_i - \bar{x}) (x_i^2 + y_i^2),$$

$$C_y = \frac{1}{2} \sum w_i (y_i - \bar{y}) (x_i^2 + y_i^2).$$

La Figura 17 pannello C, mostra il cerchio ottenuto alla fine del procedimento.

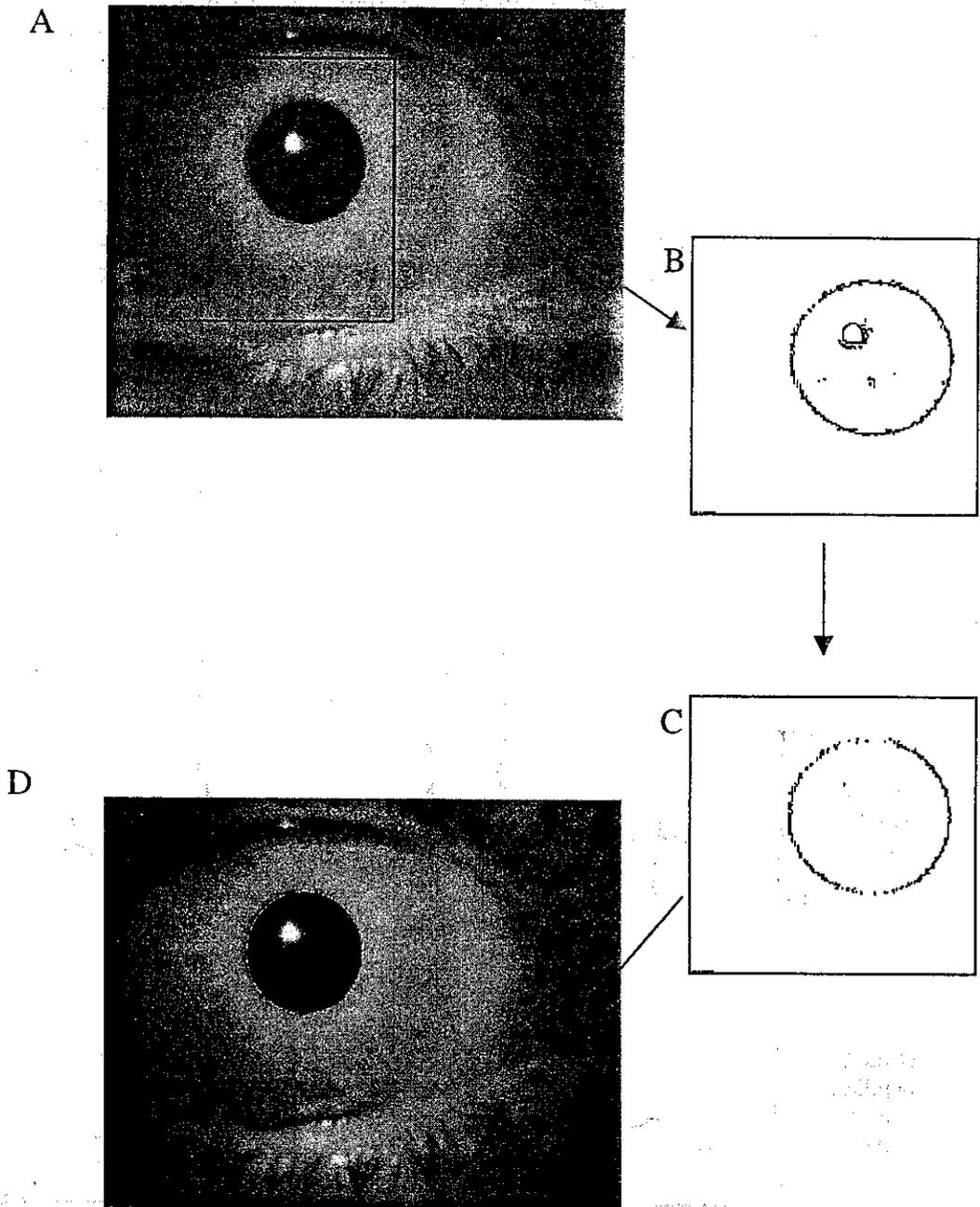


Figura 17- Esempio di riconoscimento e misura del diametro pupillare. A. Individuazione della pupilla. B. Riconoscimento dei contorni (edge detection). C. Determinazione dei punti verosimilmente appartenenti alla pupilla. D. Interpolazione circonferenziale.

Unitamente alla stima del diametro pupillare, questo algoritmo permette una stima affidabile delle coordinate del centro della pupilla. Questi dati possono essere usati per controllare e validare la qualità della registrazione. Inoltre la varianza del residuo dell'interpolazione circonferenziale fornisce informazioni significative per il riconoscimento di artefatti dovuti ad una significativa copertura della pupilla da parte della palpebra. Tali artefatti sono stati corretti mediante un'interpolazione con filtro mediano nell'intorno dell'artefatto stesso. In Figura 18 è rappresentato l'andamento dell'errore di interpolazione (in pixels²) e l'andamento del diametro della pupilla (in mm) per una registrazione di 30 secondi. Si noti come l'andamento dell'errore permetta di individuare gli artefatti da chiusura della palpebra.

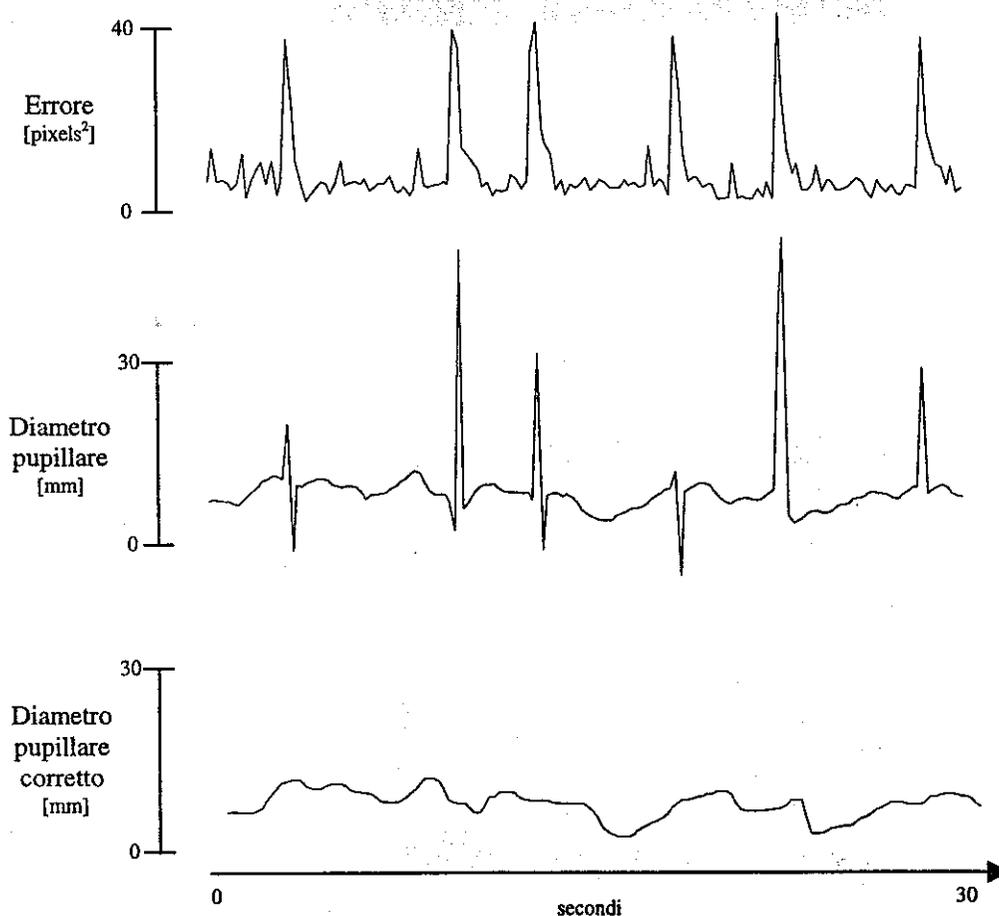


Figura 18.- Andamento dell'errore di interpolazione (varianza del residuo dell'interpolazione circonferenziale) e stima del diametro della pupilla per una registrazione di 30 secondi prima e dopo la correzione mediante filtro mediano.

4.3.3 Valutazione dell'accuratezza

La valutazione dell'accuratezza della misura del diametro pupillare passa principalmente per l'analisi degli effetti di tre ordini di cause. In primis occorre valutare l'errore introdotto dall'inevitabile compressione che il singolo frame subisce. Si tratta di una compressione con perdite, di tipo JPEG, di tasso 1:3.8. Il suo effetto è stato quantificato applicando gli algoritmi di misura agli stessi frame compressi in misura sempre maggiore. Il test è stato condotto su 5 frame diversi ciascuno di essi compresso con livelli compresi tra 1:5 e 1:99 ad intervalli di cinque. Si è verificato un andamento dell'errore (rispetto alla misura del frame incompresso) non monotono che si mantiene all'interno dello 0.08% del valore misurato fino a livelli di compressione di 10 - 15 :1 per degradare in maniera significativa le misure da livelli di 60 - 80 :1 in poi.

Una seconda causa di errore è costituita dalla deformazione che la pupilla subisce nell'immagine a causa della rotazione del globo oculare. La pupilla assume l'aspetto di un'ellisse il cui asse maggiore è pari al diametro reale, quello minore al diametro reale moltiplicato per il coseno dell'angolo formato dal piano dell'immagine con il piano tangente all'occhio nel centro della pupilla. In conseguenza di ciò l'area della pupilla risulta diminuita di un fattore pari a tale coseno.

Un ultimo test da noi condotto per valutare la robustezza degli algoritmi esaminati è consistito nella misura di 20 repliche della stessa immagine a cui sono state sommate altrettante realizzazioni di rumore bianco gaussiano a media nulla e varianza pari a 0.001. La tabella 1 riporta i risultati ottenuti.

Tabella 1. Valore medio e varianza della stima del diametro pupillare per l'algoritmo iterativo di interpolazione circonferenziale descritto nel paragrafo 5.3.2.

	Misura non affetta da rumore	Valor medio	Varianza
Algoritmo iterativo	70.8712 pixel	72.01 05 pixel	3.82 14

Le prestazioni dell'algoritmo ai minimi quadrati degradano pesantemente se l'immagine è affetta da rumore. Questo deriva dal fatto che il riconoscimento del bordo rende l'algoritmo particolarmente sensibile alle alte frequenze spaziali.

5. STUDIO SPERIMENTALE SUL CONTROLLO NEUROVEGETATIVO DELLA PUPILLA

La realizzazione del sistema pupillografico descritto ha permesso di analizzare le fluttuazioni spontanee del diametro pupillare e di individuare nel segnale rappresentativo del diametro pupillare, i ritmi propri del controllo neurovegetativo cardiovascolare.

A tal fine si è resa necessaria un'acquisizione contemporanea dei segnali di variabilità cardiaca (tacogramma), di pressione sistolica (sistogramma), del segnale respiratorio e, appunto, del segnale di variabilità del diametro pupillare (Figura 19). Questa acquisizione ambisce ad estendere al nuovo segnale in esame le conoscenze che si hanno sulle interazioni tra le componenti frequenziali caratterizzanti gli spettri dei segnali di variabilità cardiovascolare ed il loro legame con l'attività neurovegetativa.

5.1 Protocollo e setup sperimentale

L'acquisizione dei segnali di interesse per questo studio è stata effettuata su 10 soggetti giovani (5 maschi e 5 femmine), normali, in buona salute, di età compresa tra i 19 e i 28 anni e con un'età media di 25 anni. Nessuno di essi aveva nei giorni precedenti assunto farmaci o sostanze attive sul sistema nervoso autonomo.

L'acquisizione è avvenuta presso il Servizio Speciale di Fisiopatologia Clinica dell'Università di Roma "La Sapienza", sempre alla stessa ora, ed è stata posta cura nel mantenere le condizioni microclimatiche e di illuminazione del laboratorio costanti.

Il protocollo sperimentale prevedeva che i soggetti restassero seduti in posizione comoda per tutto il tempo dell'acquisizione. E' stato chiesto loro di respirare all'ascolto di un segnale acustico periodico alla frequenza costante di 0.25 Hz (15 respiri/minuto), allo scopo di separare le componenti spettrali LF e HF. E' stato dimostrato che un siffatto controllo della frequenza respiratoria non influisce sul controllo autonomo e permette una migliore stima spettrale dei segnali di interesse (17). Infine, per evitare l'insorgenza di riflessi nervosi pupillari di accomodazione, ai soggetti veniva chiesto di guardare un pannello posto alla distanza fissa di un metro.

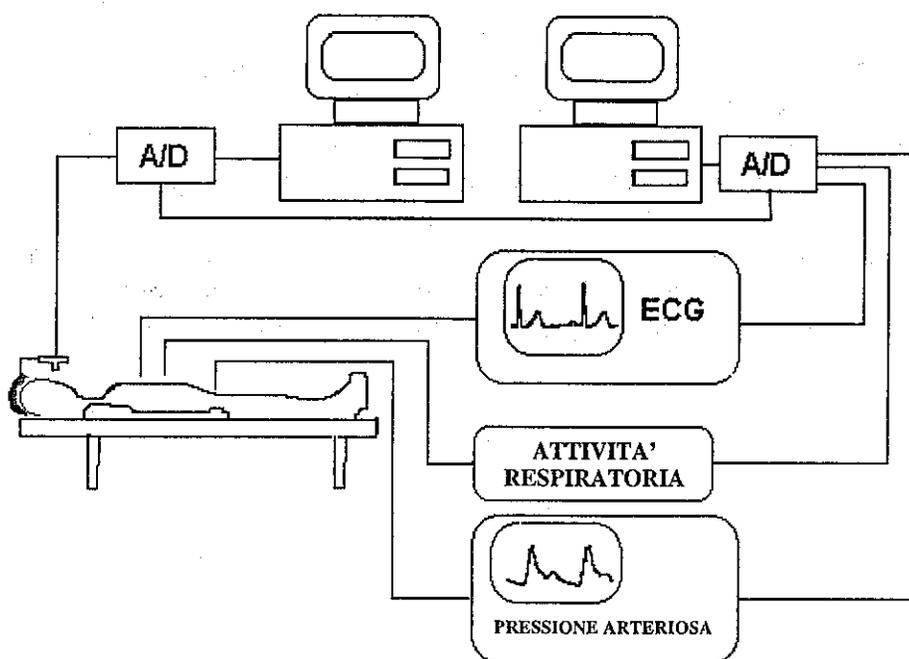


Figura 19.- Setup di acquisizione dei segnali ECG, di pressione arteriosa, di attività respiratoria e del segnale video pupillografico.

L'ECG di superficie è stato acquisito mediante un elettrocardiografo analogico. Si è ritenuta sufficiente la registrazione di una sola derivazione, in particolare è stata utilizzata la seconda, caratterizzata da una morfologia del complesso QRS più pronunciata e quindi maggiormente prestantesi al procedimento di riconoscimento di cui si parlerà in seguito.

La pressione arteriosa è stata registrata in modo continuo e non invasivo impiegando una tecnica fotopleletismografica (18) adatta ad effettuare registrazioni continue anche per tempi relativamente lunghi (qualche decina di minuti).

Il segnale respiratorio è stato rilevato mediante l'uso di una fascia elastica estensimetrica applicata sul torace (19). Esso viene espresso in unità di misura arbitrarie (arbitrary units, a.u.) per la difficoltà di ottenere una valutazione del valore assoluto del volume toracico, che richiederebbe un'accurata modellizzazione della gabbia toracica e comunque l'impiego di più fasce. D'altra parte ciò è non costituisce una limitazione ai fini del nostro studio, essendo noi interessati ad investigare le proprietà armoniche del segnale piuttosto che ad una sua accurata caratterizzazione quantitativa.

Le registrazioni di questi tre segnali sono state effettuate in modo sincrono via conversione analogico-digitale (risoluzione 12 bit, 250 campioni/s, installata su PC Intel Pentium 100).

Il segnale video pupillografico, generato da una micro telecamera di tipo CCD, è stato convertito in numerico da una scheda video anch'essa installata su una piattaforma

PC Pentium 100, in grado di convertire in standard MJPEG ad una frequenza di 5 frame/sec con un rapporto di compressione lossy di 1:3.8.

Al fine di sincronizzare l'acquisizione dei segnali cardiovascolari e di attività respiratoria con l'acquisizione del segnale video pupillografico si è introdotto un marker temporale rappresentato dall'accensione del LED di illuminazione. A tal fine uno dei canali del convertitore per l'acquisizione dei segnali riceve in ingresso la tensione di alimentazione dei LED, e l'istante dell'accensione dei diodi viene preso come tempo zero della registrazione. A partire da questo istante vengono considerati validi i valori dei segnali acquisiti, mentre la misura del diametro della pupilla procede dal primo frame "illuminato". Operando in questo modo si raggiunge la sincronizzazione dei tracciati con un margine di errore di al più 0.2 s. (intervallo temporale tra due frame). Tale approssimazione, introducendo uno sfasamento costante fra i segnali, è causa di un errore sistematico sulle loro relazioni di fase, innocuo nelle stime spettrali monovariate e nella stima della coerenza quadratica, che costituiscono gli strumenti analitici utilizzati in questo lavoro. L'errore interesserebbe l'analisi delle relazioni di fase tra i segnali, certamente interessanti dal punto di vista fisiologico, che però non costituiscono per noi oggetto di studio, implicando tra l'altro una più complessa trattazione del problema della definizione delle serie temporali di variabilità, e l'adozione di opportuni modelli di interazione tra frequenza cardiaca e pressione arteriosa (20).

5.2 Preelaborazione dei dati

In questo studio per la costruzione delle serie di variabilità è stato adottato l'approccio battito-battito, in quanto risulta essere il più frequentemente usato nelle rappresentazioni adottate nelle stime spettrali dei segnali di variabilità cardiovascolare. Pertanto le tecniche di costruzione dei segnali di variabilità cardiaca, pressoria, respiratoria e pupillare, necessitano di una precisa identificazione degli istanti di occorrenza dei battiti cardiaci.

In condizioni fisiologiche il battito cardiaco ha inizio dalla depolarizzazione di particolari cellule situate nel nodo senoatriale. L'individuazione di questo impulso elettrico sarebbe quindi una determinazione estremamente accurata dell'occorrenza dell'evento che a noi interessa. Purtroppo la rilevazione diretta dell'impulso senoatriale non è possibile senza fare uso di tecniche invasive cruenta (cateterismo cardiaco). Le informazioni a nostra disposizione per la rilevazione dell'istante di attivazione cardiaco sono dunque solo quelle contenute nel tracciato elettrocardiografico di superficie (Figura 20).

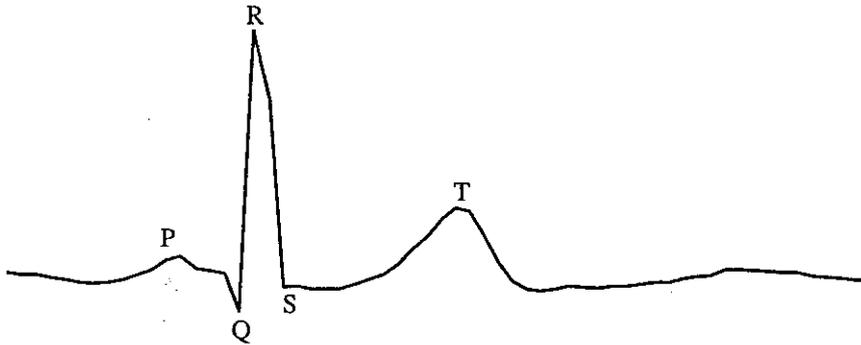


Figura 20.- Onda elettrocardiografica

L'evento che corrisponde all'origine dell'attività elettrica del ciclo cardiaco è l'inizio dell'onda P. Ancora una volta però si tratta di una condizione rigorosa dal punto di vista teorico, ma scarsamente utilizzabile in pratica. L'onda P ha infatti un'ampiezza relativamente piccola, poco adatta ad un riconoscimento automatico, e risulta quindi complesso stimarne l'istante iniziale.

La soluzione che viene utilizzata è di prendere come evento rappresentativo dell'occorrenza di un ciclo cardiaco il complesso QRS, più facile da rilevare anche in segnali piuttosto rumorosi (essendo caratterizzato da un migliore rapporto segnale/rumore). In particolare, del complesso viene scelta l'onda R, che ha l'ulteriore vantaggio di presentare una morfologia sostanzialmente costante.

Con questa scelta viene commesso un errore del tutto trascurabile, essendo esso dipendente dall'intervallo temporale tra l'inizio dell'onda P e l'occorrenza dell'onda R. Tale intervallo dipende a sua volta dalla struttura del tessuto di conduzione atrioventricolare e, in assenza di comportamenti non fisiologici di quest'ultimo, è stato dimostrato essere in ottima approssimazione costante.

Per il riconoscimento dell'onda R uno degli algoritmi più utilizzati è quello della "derivata più soglia" (21). E' sconsigliabile infatti limitarsi a cercare il massimo del tracciato elettrocardiografico nell'intervallo di interesse, magari dopo aver verificato il superamento di una prefissata soglia. La causa di ciò è che potrebbero verificarsi errori dovuti ad un'oscillazione della linea di base dell'ECG che fosse in grado di portare il picco del complesso QRS sotto soglia, ovvero all'occorrenza di un'onda T particolarmente pronunciata (come talvolta accade) che fosse tale da superarla. La derivata invece riesce ad individuare con grande precisione il complesso QRS che è sempre morfologicamente caratterizzato da una dinamica più rapida di quella delle altre onde.

Tuttavia l'algoritmo non si limita a considerare come onda R il primo punto in cui la derivata si annulla dopo aver superato la soglia, e questo per due motivi. Innanzitutto la derivata è particolarmente sensibile al rumore; inoltre la risoluzione nell'individuazione del punto di massimo sarebbe per forza di cose limitata dal periodo di campionamento usato nella conversione analogico - digitale del segnale, essendo pari alla metà di tale periodo. In realtà una volta che il superamento della soglia sulla

derivata ha fatto individuare l'occorrenza di un gruppo QRS, esso viene stimato mediante un'interpolazione parabolica ai minimi quadrati (l'interpolazione migliora la stima essendo il risultato di una minimizzazione dei quadrati degli errori), a seguito della quale viene preso come istante corrispondente all'onda R l'asse della parabola.

L'algoritmo appena descritto permette una misura dell'intervallo R-R, e quindi della frequenza cardiaca istantanea, caratterizzata da un'accuratezza sufficientemente alta.

Per la costruzione delle serie di variabilità, è necessario determinare anche i punti di massimo e di minimo dell'onda di pressione per ogni ciclo cardiaco, cioè i valori di pressione sistolica e diastolica.

Una tipica onda di pressione, o sfigmogramma (Figura 21) registrata in distretti arteriosi periferici, è caratterizzata da una rapida salita durante la contrazione ventricolare seguita da un più lento decadimento interrotto, prima del raggiungimento del livello di base (valore di pressione diastolica) dall'occorrenza di un secondo punto di massimo relativo dovuto ad un fenomeno di riflessione dell'onda di pressione conosciuto come effetto Windkessel.

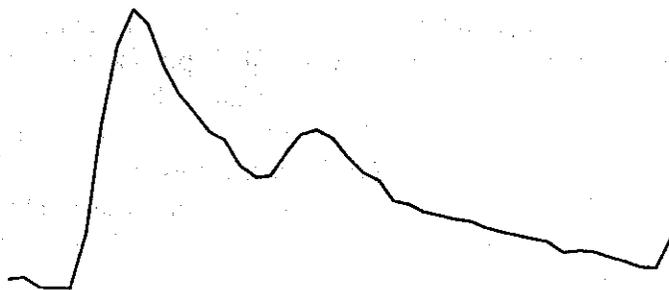


Figura 21.- Onda di pressione nei distretti arteriosi periferici.

Per la stima del valore di pressione sistolica, l'algoritmo prevede la ricerca del punto di massimo assoluto dell'onda nell'intervallo di tempo compreso tra due successivi complessi QRS (determinati per mezzo dell'algoritmo di riconoscimento dell'onda R prima descritto applicato al segnale elettrocardiografico). Anche in questo caso per migliorare l'accuratezza della stima si ricerca in realtà il massimo di una parabola analiticamente determinata secondo una stima ai minimi quadrati.

Per quanto riguarda invece la stima dei valori di pressione diastolica, essi vengono determinati per ogni onda da un algoritmo che calcola il valore minimo dello sfigmogramma come intersezione tra una funzione esponenziale interpolante il tratto di decadimento dal valore sistolico dell'onda e un'interpolazione lineare del rapido tratto iniziale dell'onda successiva.

5.3 Le serie di variabilità

Effettuato il riconoscimento delle onde R, è possibile costruire una serie temporale detta tacogramma degli intervalli, che rappresenta la variabilità della frequenza cardiaca.

Si tratta della serie uniforme di valori costituita dalla successione degli intervalli di tempo che separano un battito cardiaco dall'altro, la serie cioè delle distanze temporali tra due successive onde R. Una serie di valori così concepita non contiene tuttavia alcuna informazione temporale; questa viene recuperata assumendo la distanza temporale tra due elementi della serie (cioè tra due successivi valori dell'intervallo temporale R-R) costante e pari al periodo medio di ripetizione dei battiti. Il tacogramma assume così le caratteristiche di una funzione campionata uniformemente ad una frequenza di campionamento pari alla frequenza di attivazione cardiaca media nell'intervallo di osservazione.

Perché il tacogramma così costruito possa descrivere adeguatamente la variabilità della frequenza cardiaca è necessario che siano verificate due ipotesi.

Innanzitutto deve essere rigorosamente rispettato il teorema di Shannon, che impone, come è noto, che la frequenza di campionamento sia almeno pari al doppio della massima componente spettrale del segnale da campionare. Nel caso in esame si tratta di verificare che lo spettro del segnale di variabilità non ecceda in larghezza di banda la metà del periodo medio di ripetizione dei cicli cardiaci.

Inoltre (e questa condizione è di più difficile valutazione quantitativa) occorre che la dinamica del segnale di variabilità, ossia la sua escursione rispetto al valor medio, sia tale da permettere di trascurare l'errore che si commette attribuendo i valori degli intervalli temporali battito - battito ad istanti di tempo equispaziati.

Queste due condizioni sono fortunatamente sempre rispettate per acquisizioni di durata non superiore a qualche decina di minuti che siano effettuate in condizioni fisiologiche stabili e su soggetti (e sono la grandissima maggioranza) la cui frequenza cardiaca media non sia inferiore al doppio della frequenza degli atti respiratori.

I segnali di variabilità della pressione sistolica (massima) o diastolica (minima) si ottengono dalla successione di valori ottenuta facendo uso degli algoritmi descritti nel precedente paragrafo, corrispondono cioè ai valori massimo e minimo di ciascuna delle onde di pressione (sistogramma e diastogramma).

Questo procedimento è equivalente ad un campionamento non uniforme del segnale pressorio. Il segnale ottenuto può tuttavia, sotto opportune ipotesi ancora una volta dettate dal teorema di Shannon e dalla necessità di trascurare l'errore commesso considerando costante la frequenza cardiaca, essere assimilato ad una serie uniforme e considerarsi ben rappresentativo della variabilità della pressione arteriosa sistolica o diastolica.

A causa tuttavia della particolare forma di campionamento effettuata, l'unità di misura che compare sull'asse delle ascisse nello spettro del segnale è cicli/battito, ancora una volta cioè si è persa l'informazione temporale, essendosi effettuato il campionamento in corrispondenza di ogni ciclo cardiaco del tutto indipendentemente dall'istante temporale in cui esso si è verificato. Per recuperare tale informazione, in

modo del tutto analogo a quanto si è fatto nel caso del tacogramma, si assume che la distanza temporale tra gli elementi della serie sia pari al periodo cardiaco medio. Con l'adozione di tale accorgimento, le grandezze sull'asse delle ascisse dello spettro saranno moltiplicate per la frequenza media di ripetizione dei battiti, e quindi su tale asse non comparirà più l'unità di misura cicli/battito, ma $(\text{cicli/battito}) \times (\text{battiti/s})$. Questa unità di misura, avente le dimensioni degli hertz, è in letteratura riferita con il nome di hertz equivalente. E' stato dimostrato che l'errore che si commette ricorrendo a questo tipo di rappresentazione risulta accettabilmente trascurabile (22).

Restano da esaminare i criteri di definizione dei restanti due segnali di interesse in questo lavoro: il segnale respiratorio ed il pupillogramma. Le considerazioni da farsi a tal riguardo sono del tutto analoghe a quelle fatte per il sistogramma e per il diastogramma.

In considerazione del fatto che in condizioni normali, facilmente riproducibili in acquisizioni di laboratorio, il contenuto frequenziale di questi segnali è tale da rispettare largamente il teorema di Shannon ad una frequenza di campionamento di circa un Hertz, si può campionare l'attività respiratoria e la funzione di variazione del diametro pupillare in corrispondenza dell'evento di un battito, recuperando l'informazione temporale come al solito con l'artificio di moltiplicare i valori dell'asse delle ascisse nello spettro per la frequenza media di attivazione cardiaca. I segnali ottenuti sono rispettivamente il respirogramma ed il pupillogramma. Si può dimostrare che per segnali "lentamente" variabili la distorsione introdotta dal campionamento non uniforme è sostanzialmente trascurabile.

Questo procedimento di campionamento non presenta particolari difficoltà se applicato al segnale respiratorio, che viene acquisito ad una frequenza di 250 Hz, pari a quella con la quale vengono acquisiti il segnale elettrocardiografico e l'onda di pressione. In considerazione del contenuto frequenziale significativo del segnale respiratorio, il quale è praticamente una lenta sinusoidale (nel nostro protocollo a 0.25 Hz), non si commette un grande errore a considerare come campione corrispondente all'occorrenza di battito, quello ad essa temporalmente più vicino.

Un po' più complicata è invece la costruzione della serie di variabilità del diametro pupillare (*pupillogramma*). La frequenza di campionamento temporale con la quale vengono acquisiti i frame della pupilla è stata scelta pari a 5 Hz, troppo bassa per poter accettare l'errore legato alla scelta del frame più vicino all'occorrenza del battito, che risulterebbe di ± 0.1 secondi. Il tracciato pupillografico viene allora sovracampionato operando uno *zero-padding* opportuno sui campioni della sua trasformata e antitrasformando lo spettro così ottenuto (senza quindi alterare il suo contenuto informativo). A seguito di questa operazione, la frequenza di campionamento viene portata a 250 Hz (scelta fatta per ragioni di omogeneità con gli altri segnali). A questo punto la costruzione della serie di variabilità può procedere con la scelta del campione più vicino all'istante di occorrenza del battito (come viene fatto per il respiro) commettendo un errore massimo di ± 0.001 secondi. La Figura 22 mostra le convenzioni usate per la costruzione delle serie di variabilità dei segnali cardiovascolari, dell'attività respiratoria e del diametro pupillare.

5.4 Risultati

In Figura 23 è mostrato l'andamento nel tempo (c) e lo spettro di densità di potenza (f) di una serie pupillografica ottenuta durante il respiro controllato a 15 respiri/minuto, unitamente alla serie del respirogramma (a) e del tacogramma (b), per uno dei soggetti analizzati. Dallo spettro di densità di potenza del pupilogramma (f) sono evidenti le componenti spettrali LF ed HF che caratterizzano anche lo spettro di densità di potenza del tacogramma (e).

La Figura 24 mostra come le componenti LF ed HF dei segnali di variabilità cardiovascolare (tacogramma e sistogramma) siano correlate a quelle presenti nelle serie pupillografiche.

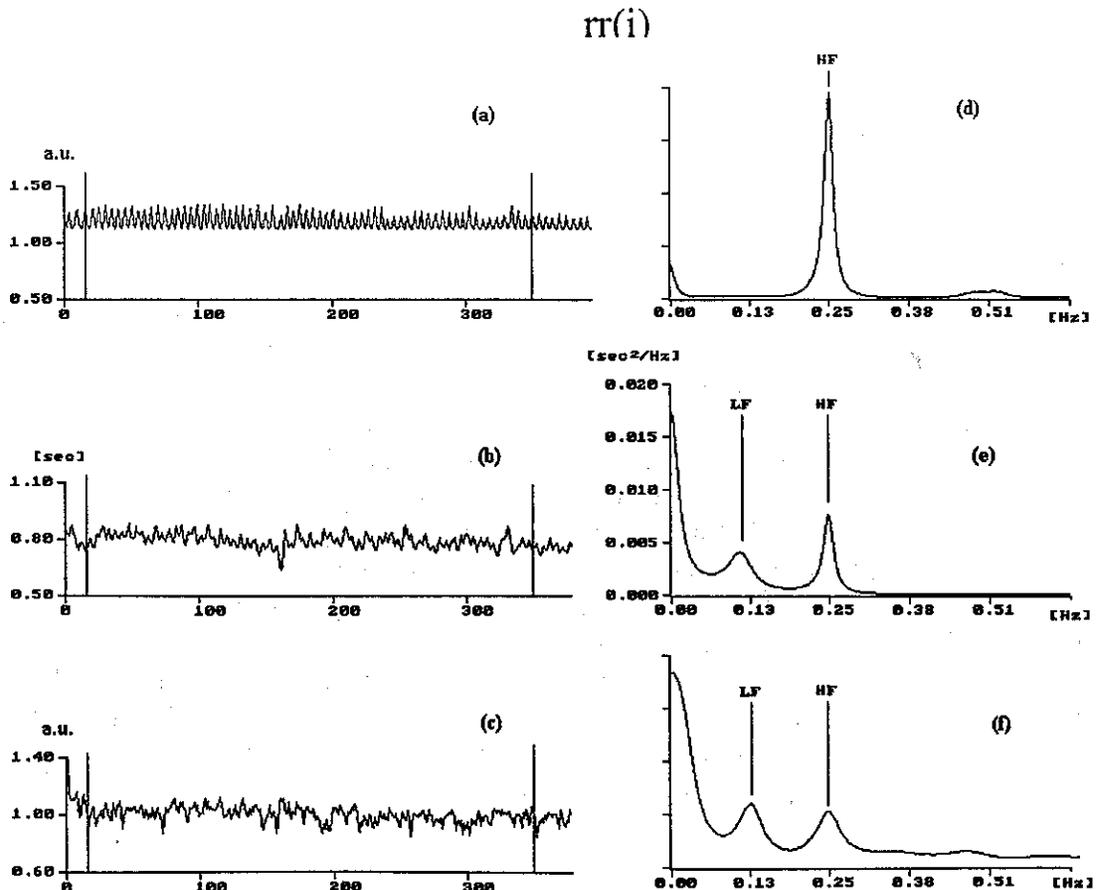


Figure 23.- Respirogramma (a), tacogramma (b), e pupilogramma (c).
Spettro di densità di potenza del respirogramma (d), tacogramma (e) e del pupilogramma (f).

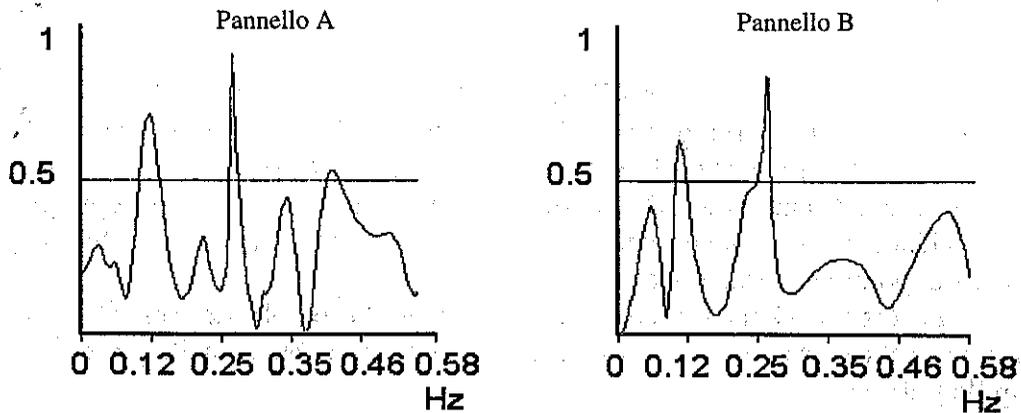


Figura 24.- Coerenza spettrale tra il tacogramma ed il pupillogramma (pannello A) e tra il sistogramma ed il pupillogramma (pannello B).

La componente respiratoria presente nelle fluttuazioni del diametro pupillare conferma risultati ottenuti da studi precedenti (8)(10). L'identificazione di una componente spettrale nella banda LF delle fluttuazioni spontanee del diametro pupillare rappresenta invece un risultato nuovo. La coerenza spettrale di questo ritmo con quelli presenti nel tacogramma e sistogramma è risultata significativa (>0.5) in 6 soggetti su 10. Questo risultato può essere spiegato considerando che la potenza di questa componente nel tacogramma e nel sistogramma è relativamente bassa a causa della condizione di REST dei soggetti e/o dell'effetto del respiro controllato.

I risultati ottenuti da questo studio sperimentale suggeriscono la possibilità di usare l'analisi spettrale come una misura non invasiva della funzionalità del sistema nervoso autonomo, che potrebbe fornire informazioni aggiuntive rispetto all'analisi della variabilità delle grandezze cardiovascolari.

A questo scopo, specifici protocolli e test dovrebbero essere adottati al fine di investigare e chiarire in che misura questi ritmi sono espressione di cambiamenti meccanici della pressione arteriosa o di fenomeni puramente neurali.

CONCLUSIONI E PROSPETTIVE

Obiettivo dello studio era quello di realizzare un sistema pupillografico innovativo adatto ad un utilizzo di tipo clinico, come parte di un sistema di acquisizione multisegnale. A tal fine è stato utilizzato una microtelecamera analogica montata su un caschetto e connessa ad un convertitore A/D. E' stato inoltre sviluppato il software per l'acquisizione, il riconoscimento dei diametri pupillari e la rimozione degli artefatti. Il software prevede inoltre la generazione del segnale di sincronismo per l'acquisizione simultanea di altri segnali fisiologici. Le prestazioni del sistema sono state accuratamente valutate. I risultati preliminari di un utilizzo combinato del sistema pupillografico e di un sistema di acquisizione di segnali cardiovascolari ha permesso di identificare nelle fluttuazioni spontanee del diametro pupillare ritmi presenti nei segnali di variabilità cardiovascolare, considerati indici dell'attività di controllo della pupilla mediata dal sistema nervoso autonomo. I risultati presentati in questo studio e quelli riportati nella letteratura disponibile sull'argomento, suggeriscono che l'analisi delle fluttuazioni spontanee del diametro pupillare rappresenti tuttora un campo di sicuro interesse, ma largamente inesplorato. Il pupillometro progettato permetterà in futuro di descrivere in maniera più completa le fluttuazioni del diametro pupillare in diverse condizioni fisiologiche e patologiche. L'analisi nel dominio della frequenza sembra poter fornire degli indici significativi per la valutazione del controllo autonomo pupillare e, indirettamente, del bilanciamento simpato-vagale.

Possibili applicazioni pupillografiche riguardano lo studio dell'affaticamento e dell'effetto della dilatazione sulla visione e sulla capacità di guida. Recenti studi hanno infatti dimostrato che la fatica dovuta alla mancanza di sonno cambia significativamente molti parametri pupillari (23) e che la dilatazione della pupilla provoca un peggioramento della capacità visiva e delle performance di guida anche in periodi diurni e in soggetti giovani (24). Questi risultati, che necessitano studi più approfonditi su ampie popolazioni, indicano una possibile applicazione della pupillografia nella prevenzione di colpi di sonno, una delle cause maggiori di incidenti stradali.

Un'altra applicazione interessante riguarda lo studio della depressione: è infatti stato mostrato che la dimensione pupillare fornisce un indice di una funzione noradrenergica diminuita in pazienti depressi (25). Il monitoraggio della funzione neurovegetativa mediante la stima del diametro pupillare è stato utilizzato anche nello studio del morbo di Alzheimer, che porta anche ad un deficit colinergico. E' opinione diffusa che la dinamica pupillare può fornire informazioni importanti nella diagnosi precoce del morbo (26). Gli studi sopra citati hanno in comune l'analisi del diametro pupillare attraverso metodi estremamente semplificati, prevalentemente di tipo statico, non approfondendo cioè gli aspetti dinamici delle fluttuazioni pupillari.

Infine molto potrebbe essere fatto in termini di modellizzazione neuromuscolare del controllo della pupilla, sia in condizioni fisiologiche che in condizioni che

prevedano il blocco della branca simpatica o parasimpatica. A tal fine potrebbe essere studiata in termini modellistici la risposta della pupilla in soggetti normali a diversi tipi di stimoli luminosi, e analizzare quali parametri del modello variano per un blocco simpatico e/o parasimpatico. Il modello potrebbe poi essere usato per studiare patologie quali diabete, alcolismo, neoplasie cerebrali, sclerosi multipla e/o altre caratterizzate da deficit neurovegetativi.

BIBLIOGRAFIA

- 1) Carta F. Neuroftalmologia. Brescia: Ed. La Goliardica, 1984.
- 2) Loewy AD, Araujo JC, Kerr FW. Pupillodilator pathways in the brain stem of the cat: anatomical and electrophysiological identification of a central autonomic pathway. *Brain Res* 1973 60(1):65-91
- 3) Tsukahara N, Kiyoura T, Ijichi Y. The mode of cerebellar control of pupillary light reflex. *Brain Res* 1973 60(1):244-8
- 4) Passatore M, Pettorossi VE. Efferent fibers in the cervical sympathetic nerve influenced by light. *Exp Neurol* 1976 52(1):66-82
- 5) Usui S, Stark LW, A model for non-linear stochastic behaviour of the pupil. *Biol Cyber* 1982 45:13-21
- 6) Borgdorff P. Respiratory fluctuations in pupil size. *Am J Physiol* 1975 228(4):1094-1102
- 7) Otshuka K, Asakura K, Kawasaki H, Sawa M, Respiratory fluctuations of the human pupil. *Exp Brain Res* 1988 71:215-217
- 8) Yoshida H, Yana K, Okuyama F, Takashi T. Time-varying properties of respiratory fluctuations in pupil diameter of human eyes. *Meth Inf Med* 1994 33:46-48
- 9) Task Force, Heart Rate Variability, Standard of measurement, physiological interpretation and clinical use, *Circulation* 1996 93:1043-1065
- 10) Smith SE, Smith SA, Brown PM, Fox C, Sonksen PH Pupillary signs in diabetic autonomic neuropathy. *Br Med J* 1978 2(6142):924-7
- 11) Yoshida H, Miuta H, Gouhara T, Suzuki Y, Yana K, Okuyama F. Statistical properties of simultaneously recorded fluctuations in pupil diameter and heart rate. *Proc. IEEE-EMBS Conf.* 1995.
- 12) Murata A, Iwase H, Evaluation of mental workload by fluctuation analysis of pupil area, *IEEE/EMBS Conf. Proc.* 1998 3094-3097
- 13) Calcagnini G, Censi F, Lino S, Cerutti S Spontaneous fluctuations of human pupil reflect central autonomic rhythms. *Methods Inf Med* 2000 39(2):142-5
- 14) Myers GA, Sherman KR, Stark LW. *Eye Monitor Computer* 1991 14:21
- 15) Groen E, Bos JE, Nacken PFM, de Graaf B. Determination of ocular torsion by means of automatic pattern recognition. *IEEE Trans. on Biom. Eng.*, 1996 43(5):471-78
- 16) Chaudhuri BB, Kundu P. Optimum circular fit to weighted data in multidimensional space. *Pattern Recog. Lett.* 1993 14(1):6
- 17) Bernardi L, Leuzzi S, Radaelli A, Passino C, Johnston JA, Sleight P Low-frequency spontaneous fluctuations of R-R interval and blood pressure in conscious humans: a baroreceptor or central phenomenon? *Clin Sci (Colch)* 1994 87(6):649-54
- 18) Penaz J. Mayer waves : history and methodology *Automedica* 1978 2:135-141
- 19) Branca FP, Mastrantonio F, Calcagnini G, Cerutti S. simple low cost transducer for breath detection over 24H in clinical cardiology. *Proc 17th Annual International Conference of the IEEE EMBS, Montreal* 1995.
- 20) De Boer RW, Karemaker JM Strackee J. Comparing spectra of a series of point events particularly for heart rate variability data *IEEE Trans. BME* 1985 31:384-387
- 21) Baselli G, Cerutti S, Civardi S, Liberati D, Lombardi F, Malliani A, Pagani M. Spectral and cross-spectral analysis of heart rate and arterial blood pressure variability signals. *Comput Biomed Res* 1986 19(6):520-34
- 22) Pagani M, Lombardi F, Guzzetti S, Rimoldi O, Furlan R, Pizzinelli P, Sandrone G, Malfatto G, Dell'Orto S, Piccaluga E, et al. Power spectral analysis of heart rate and arterial pressure variabilities as a marker of sympatho-vagal interaction in man and conscious dog. *Circ Res* 1986 59(2):178-93
- 23) Morad Y, Lemberg H, Yofe N, Dagan Y. Pupillography as an objective indicator of fatigue. *Curr Eye Res* 2000 21(1):535-542
- 24) Potamitis T, Slade SV, Fitt AW, McLaughlin J, Mallen E, Auld RJ, Dunne MC, Murray PI The effect of pupil dilation with tropicamide on vision and driving simulator performance. *Eye* 2000 14 (Pt 3A):302-6

- 25) Sokolski KN, Nguyen BD, DeMet EM. Decreases in dilated pupil size in depressed patients with age may reflect adrenergic changes. *Psychiatry Res* 2000 17;94(3):267-72
- 26) Fotiou F, Fountoulakis KN, Tsolaki M, Goulas A, Palikaras A. Changes in pupil reaction to light in Alzheimer's disease patients: a preliminary report. *Int J Psychophysiol* 2000 37(1):111-20

*Direttore dell'Istituto Superiore di Sanità
e Direttore responsabile: Giuseppe Benagiano*

*Stampato dal Servizio per le attività editoriali
dell'Istituto Superiore di Sanità, Viale Regina Elena, 299 - 00161 ROMA*

*La riproduzione parziale o totale dei Rapporti e Congressi ISTISAN
deve essere preventivamente autorizzata.*

Reg. Stampa - Tribunale di Roma n. 131/88 del 1° marzo 1988

Roma, dicembre 2000 (n. 4) 9° Suppl.

ISTISAN - Istituto Nazionale per lo Studio e la Cura delle Infezioni e le Malattie Sessualmente Trasmesse
Via S. Maria della Spina, 15 - 00186 Roma - Tel. 06/49901 - Telex 320333 - Fax 06/4990111

**La responsabilità dei dati scientifici e tecnici
pubblicati nei Rapporti e Congressi ISTISAN è dei singoli autori**

ISTISAN - Istituto Nazionale per lo Studio e la Cura delle Infezioni e le Malattie Sessualmente Trasmesse

Via S. Maria della Spina, 15 - 00186 Roma - Tel. 06/49901 - Telex 320333 - Fax 06/4990111