

**ALMA MATER STUDIORUM
UNIVERSITÀ DI BOLOGNA**

CAMPUS DI CESENA

SCUOLA DI INGEGNERIA E ARCHITETTURA

CORSO DI LAUREA IN INGEGNERIA BIOMEDICA

TITOLO DELL'ELABORATO

**Tecnologie biomediche per lo studio e la
riabilitazione della funzionalità retinica in
condizioni fisiopatologiche.**

Elaborato in
FISIOLOGIA

Relatore

Valentina Benfenati

Presentata da

Roberta Fabbri

Sessione I - Appello II

Anno Accademico 2014/2015

Alla mia famiglia

INDICE

INTRODUZIONE	1
I. L'OCCHIO E LA VISIONE	5
I.1 Anatomia e fisiologia dell'occhio	5
I.2 Analisi delle informazioni visive nella retina	9
I.2.1 L'organizzazione della retina	10
I.2.2 I fotorecettori.....	13
I.2.3 La fototrasduzione	16
I.2.4 L'output della retina	24
I.3 Le vie visive centrali	29
II. LE PATOLOGIE DELLA RETINA	38
II.1 Test strumentali per la diagnosi delle retinopatie	39
II.1.1 L'esame del fondo oculare.....	40
II.1.2 L'esame del visus e l'esame del campo visivo	41
II.1.3 Gli esami elettro-funzionali	41
II.1.4 L'OCT e le tecniche angiografiche.....	43
II.2 Retinopatie associate alla degenerazione dei fotorecettori.....	45
II.2.1 La degenerazione maculare legata all'età	45
II.2.2 La retinite pigmentosa.....	49
III. SISTEMI ARTIFICIALI IMPIANTABILI PER IL RECUPERO DELLA FUNZIONALITÀ VISIVA	53
III.1 Protesi retinali.....	57
III.2 Siti d'applicazione della protesi retinale	66
III.2.1 Stimolazione epiretinale	67
III.2.2 Stimolazione subretinale.....	73
III.3 Protesi del nervo ottico e protesi corticali	79
III.4 Protesi retinali ibride	83
IV. PROSPETTIVE DI FRONTIERA PER LA VISIONE ARTIFICIALE	85
IV.1 Tecniche ottiche per la modulazione dell'attività neuronale	86

IV.1.1 L'optogenetica	89
IV. 2 Semiconduttori organici fotosensibili.....	99
IV.2.1 La modulazione del potenziale di membrana mediante l'utilizzo di polimeri fotosensibili.....	101
IV.2.2 L'applicazione di dispositivi fotovoltaici organici nelle degenerazioni retiniche	106
IV.2.3 Dispositivi optoelettronici organici	112
IV.2.4 Dispositivi ibridi	119
CONCLUSIONE.....	127
BIBLIOGRAFIA/SITOGRAFIA	131
RINGRAZIAMENTI.....	137

INTRODUZIONE

La percezione visiva è alla base della conoscenza e della consapevolezza del mondo esterno. La vista è il senso speciale che presiede alla visione, il complesso meccanismo di traduzione della luce riflessa dagli oggetti in un'immagine mentale che costituisce la rappresentazione cosciente dell'ambiente circostante.

Il processo di analisi ed elaborazione del segnale luminoso ha inizio nella retina, una membrana fotosensibile che ricopre l'interno del bulbo oculare, e prosegue, attraverso il nervo ottico, nei centri cerebrali superiori. Retina e cervello interagiscono e collaborano nel difficile compito di afferrare la luce e trasformarla in una scena visiva che abbia senso. Straordinario è il contributo della componente retinica: dotata di cellule fotosensibili, essa assorbe le radiazioni luminose incidenti trasducendole in impulsi nervosi che, proiettando successivamente alle aree visive della corteccia cerebrale, verranno interpretati ed elaborati ulteriormente fino a livello percettivo. Il risultato è la sensazione della scena che stiamo osservando, in tutti i suoi complicati dettagli di forma, colore, profondità, movimento e struttura.

Essendo parte del sistema nervoso centrale, la retina è costituita da elementi nervosi non rigenerabili, pertanto qualsiasi lesione determina danni anatomici e funzionali spesso permanenti. Patologie associate alla degenerazione dei fotorecettori retinici, come la retinite pigmentosa e la degenerazione maculare senile, sono causa della progressiva perdita della vista, che nei casi peggiori conduce alla cecità completa. Le accurate metodologie diagnostiche a disposizione consentono lo studio approfondito dello stato funzionale della retina in condizioni fisiopatologiche e l'osservazione del decorso della malattia. La progressione della degenerazione fotorecettoriale si differenzia in funzione delle aree coinvolte, potendo interessare la zona centrale della retina o gradualmente l'intero tessuto.

Le strategie terapeutiche messe a punto per il trattamento delle distrofie retiniche si limitano al rallentamento della malattia, mentre sono in corso lo studio e la progettazione di sistemi impiantabili per la visione artificiale, come alternativa altamente ingegneristica. L'obiettivo consiste nella realizzazione di dispositivi in grado di generare artificialmente una percezione visiva, attraverso la stimolazione elettrica dei circuiti nevosi residui. Bypassando le stazioni danneggiate del percorso visivo e interfacciandosi alle strutture ancora vitali, la protesi può essere impiantata in punti qualsiasi della circuiteria di elaborazione dell'informazione visiva. Pertanto i sistemi impiantabili visivi si distinguono in protesi retinali, protesi del nervo ottico e protesi corticali.

La presente tesi si propone di analizzare gli step dell'Ingegneria biomedica nell'attuazione di tecnologie per la visione artificiale, con particolare attenzione all'approccio intraoculare e ai più importanti progetti di retina elettronica realizzati finora. L'analisi di requisiti, struttura, funzionamento e limiti è fondamentale per la comprensione degli effetti che la protesi retinica è in grado di produrre sulla qualità di vita del paziente.

Attualmente la tecnologia per impianti retinali segue due differenti direzioni: la stimolazione epiretinale e la stimolazione subretinale. La protesi retinica ha il compito di suscitare nel paziente risposte nervose alla luce, avvalendosi di un'architettura deputata a riprodurre le funzioni del sistema sensoriale visivo. Questa è costituita da un'unità esterna di acquisizione ed elaborazione dell'immagine e da un'unità interna dotata di un chip di stimolazione ed array di microelettrodi e/o microfotodiodi, impiantati sulla superficie della retina. Sebbene la percezione artificiale non possa garantire i dettagli e l'alta qualità della visione naturale, l'obiettivo, nel breve termine, è consentire al paziente di recuperare una maggiore autosufficienza motoria. Il ripristino della visione normale rimane il traguardo, nel lungo termine, degli studi nel settore dei sistemi visivi impiantabili. Al contempo, approcci alternativi alla stimolazione elettrica, come le tecniche ottiche per la modulazione dell'attività neuronale mediante la luce e l'emergente tecnologia optogenetica per il controllo dei processi

cellulari attraverso la fotoattivazione di neuroni ingegnerizzati, aprono la strada a nuove possibilità di soluzione per le patologie neurodegenerative della retina. L'ultima sezione di questo lavoro è dedicata alla discussione delle prospettive di frontiera per la visione artificiale; nello specifico, intende illustrare le proprietà meccaniche ed optoelettroniche dei semiconduttori organici e la loro potenziale applicazione nel contesto delle protesi retinali, come interfaccia biorganica fotovoltaica fra i componenti elettronici e i tessuti viventi.

I. L'OCCHIO E LA VISIONE

L'occhio è l'organo di senso responsabile della visione. Uno strumento ottico il cui principio di funzionamento è paragonabile a quanto avviene in una macchina fotografica. Esso concentra la luce su una superficie fotosensibile, la retina, per mezzo di una lente chiamata cristallino, controllando l'intensità dello stimolo luminoso in ingresso grazie ad un'apertura di diametro regolabile, la pupilla. Le strutture che compongono il sistema oculare, in delicato equilibrio fra loro, concorrono a realizzare l'importante funzione della visione, il processo tramite il quale la luce riflessa dagli oggetti presenti nell'ambiente viene tradotta in immagine mentale.

Nel primo stadio dell'elaborazione visiva, l'impulso luminoso colpisce l'occhio e viene modulato ed aggiustato prima di essere focalizzato sulla retina. Qui si compie la fase più complessa della visione: i fotorecettori retinici trasformano i fotoni in una serie di segnali elettrici, che verranno successivamente trasmessi, attraverso la via ottica, al sistema nervoso centrale per essere interpretati ed elaborati, dando luogo alla percezione dell'immagine visiva [2].

I.1. ANATOMIA E FISIOLOGIA DELL'OCCHIO

L'occhio, o bulbo oculare, è un recettore sensoriale, cioè un trasduttore che converte lo stimolo sensoriale proveniente dall'ambiente in informazioni che possono essere comprese dal sistema nervoso. La specifica forma di energia che l'occhio è in grado di percepire e processare è la luce, raccolta in quanti di energia elettromagnetica, detti fotoni. La struttura multicellulare altamente organizzata è alla base della capacità del sensore visivo di rispondere allo stimolo luminoso.

L'occhio è un organo complesso e delicato, simile ad una sfera imperfetta del diametro di circa 2.5 cm e posizionato nella cavità orbitaria del cranio. Il suo peso è intorno ai 7 grammi e la sua notevole consistenza è dovuta alla pressione dei liquidi (15 mm/Hg) contenuti nella cavità del globo oculare. Le strutture esterne accessorie all'occhio comprendono sei muscoli oculari estrinseci o extraoculari (4 retti e 2 obliqui), ancorati esternamente alla superficie del bulbo oculare e organizzati in tre coppie di muscoli antagonisti, dalla cui azione dipendono i movimenti dell'occhio. Questi muscoli sono innervati dai nervi cranici III, IV e VI. Le palpebre, superiore e inferiore, si chiudono sulla superficie anteriore dell'occhio. La congiuntiva, una membrana mucosa sottile e trasparente, riveste la superficie interna delle palpebre e quella anteriore del bulbo oculare, congiungendole. L'apparato lacrimale, un sistema di ghiandole e dotti, rilascia un continuo flusso di lacrime che lavano la superficie esposta, permettendole di restare umida e libera da detriti. La secrezione delle lacrime è provocata da neuroni parasimpatici che fanno parte del VII paio di nervi cranici. Orbita, muscoli extraoculari, palpebre, apparato lacrimale e congiuntiva costituiscono l'insieme degli annessi oculari deputato alla protezione dell'occhio dall'ambiente esterno.

Il globo oculare è diviso in due compartimenti (o camere) separate da una lente. Il cristallino, la lente naturale dell'occhio, è un disco trasparente ed elastico, mantenuto in sospensione grazie all'apparato zonulare che lo connette ai muscoli ciliari. Tramite il processo di accomodazione, che consiste nella variazione del grado di curvatura del cristallino a opera dei muscoli ciliari, esso è in grado di compiere gli aggiustamenti necessari per mettere a fuoco sulla retina oggetti posti a diversa distanza. Insieme alla cornea forma il sistema ottico dell'occhio.

La camera anteriore, localizzata davanti al cristallino, contiene umore acqueo, un liquido salino povero di proteine e simile al plasma, con funzione nutritiva; esso viene secreto dall'epitelio ciliare che circonda il cristallino e riassorbito attraverso il canale di Schlemm. La camera posteriore è invece molto più ampia ed è occupata dal corpo vitreo (o umore

vitreo), una matrice gelatinosa e trasparente (composta per il 99% da acqua e per l'1% da acido ialuronico) che contribuisce a mantenere la forma dell'occhio. Un insufficiente riassorbimento dell'umore vitreo provoca un aumento della pressione intraoculare (glaucoma) che può rappresentare un pericolo per l'irrorazione della retina e condurre quindi a cecità.

La parete esterna dell'occhio, la sclera, è una membrana biancastra costituita da tessuto connettivo; l'andamento irregolare delle fibre di collagene la rendono opaca.

La luce entra nell'occhio attraverso la cornea, un disco di tessuto trasparente che è situato sulla superficie anteriore e si continua con la sclera. Anch'essa contiene fibre di collagene il cui diametro e la cui disposizione regolare ne consentono la trasparenza. Cornea e sclera formano la tonaca più esterna dell'occhio, di tipo fibroso e deputata a funzioni di protezione e sostegno. Il confine che le separa prende il nome di orlo sclerocorneale o limbus.

Più internamente, si estende la tonaca vascolare dell'occhio (o uvea), una membrana connettivale altamente vascolarizzata, con funzione metabolica: assicurare un'adeguata nutrizione alla retina. Si suddivide in tre parti: coroide, corpo ciliare e iride. Nel centro dell'iride vi è un foro, la pupilla, attraverso cui la luce entra nell'occhio. La quantità di luce che entra è controllata dalla dilatazione o contrazione della pupilla. L'iride contiene fibre muscolari lisce disposte radialmente o circolarmente che costituiscono, rispettivamente, l'apparato per la chiusura o l'apertura della pupilla. L'iride funge quindi da diaframma di regolazione del diametro pupillare. La coroide contiene pigmenti ed è particolarmente ricca di vasi sanguigni, parte dei quali irrorano gli strati esterni della retina. Gli strati interni della retina ricevono invece sangue dai rami dell'arteria centrale della retina che decorrono parallelamente al nervo ottico.

La retina costituisce la tonaca più interna del bulbo oculare, un tessuto nervoso multistrato in grado di catturare gli stimoli luminosi trasformandoli in segnali elettrici che, tramite il nervo ottico, giungono ai centri di controllo ed elaborazione cerebrali. Gli assoni delle cellule nervose retiniche e i vasi

sanguigni lasciano l'occhio a livello del disco ottico, punto in cui origina il nervo ottico (il secondo paio dei nervi cranici) [1], [2].

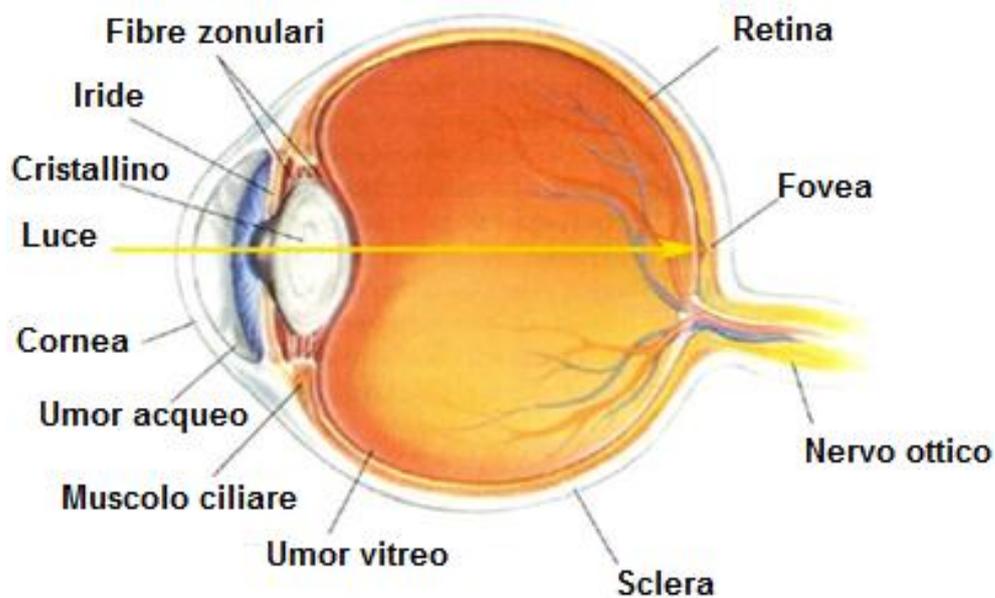


Figura 1 - Sezione sagittale dell'occhio umano.



Figura 2 - Immagine del fondo oculare, visualizzata tramite esame oftalmoscopico.

Ad un esame oftalmoscopico, si può osservare che la retina è attraversata da piccole arterie e vene che escono come raggi da una macchia cieca, il disco ottico, il cui colore chiaro denota la mancanza di fotorecettori. La macchia

di forma ovale più scura rispetto alle regioni circostanti è invece la macula lutea, la parte della retina preposta alla visione distinta e alla percezione dei dettagli, grazie all'elevata densità di fotorecettori. Al centro della macula si riconosce la fovea, caratterizzata da un ulteriore aumento della quantità di fotorecettori: essa rappresenta il punto di massima acuità visiva della retina.

I.2 ANALISI DELLE INFORMAZIONI VISIVE NELLA RETINA

I processi che conducono alla percezione visiva prendono inizio nella retina, la struttura sensoriale specializzata dell'occhio. La luce che penetra attraverso la cornea viene proiettata sul fondo oculare, dove ha luogo la fototrasduzione, cioè la trasduzione dell'energia luminosa in energia elettrica. In realtà solo una parte della luce che entra nell'occhio viene percepita dal sistema nervoso.

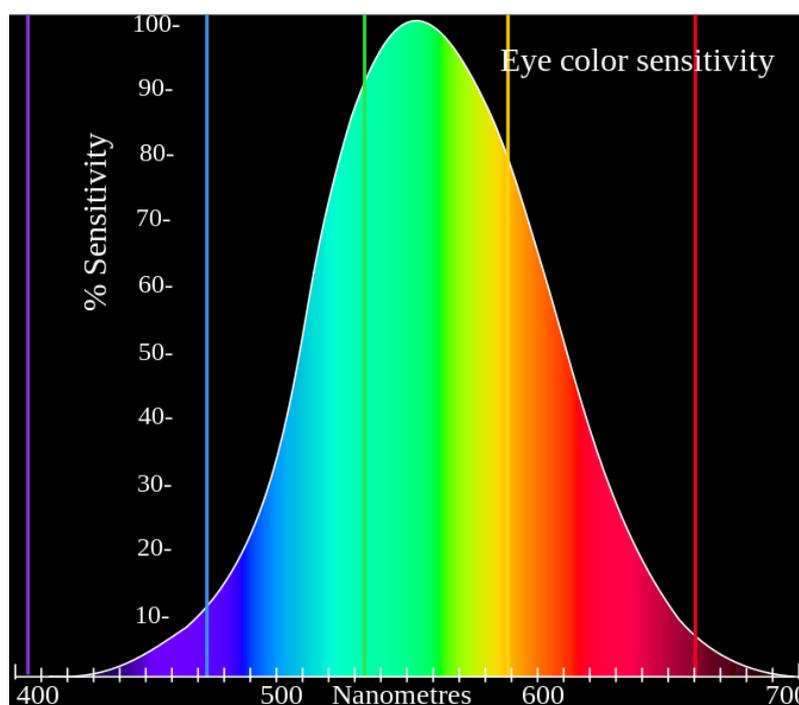


Figura 3 - Curva di sensibilità media dell'occhio umano in funzione della lunghezza d'onda.

La luce è un'onda elettromagnetica che si propaga nello spazio alla velocità di 3×10^8 m/s. La luce visibile è la porzione dello spettro elettromagnetico che impressiona l'organo della vista, evocando la sensazione visiva, caratterizzata da onde con frequenza compresa fra 4 e 7.5×10^{14} hertz e lunghezza d'onda fra i 400 e i 700 nanometri.

Ogni frequenza costituisce, per l'occhio umano, un diverso colore. La sensibilità media dell'occhio ad un colore varia in funzione della lunghezza d'onda ed è massima in corrispondenza di 560 nm.

La sensibilità dell'occhio umano alla luce visibile è dovuta alle proprietà fotosensibili della retina. I fotorecettori retinici sono responsabili dell'assorbimento delle onde elettromagnetiche e sono sede del processo di fototrasduzione, il quale dà luogo a fenomeni di amplificazione all'interno del circuito retinico in funzione della quantità di luce disponibile.

La retina merita di essere analizzata con cura poiché rappresenta un prezioso modello di rete di contatti sinaptici fra diversi neuroni, che, combinando complessità fisiologica e organizzazione strutturale, è alla base di un meccanismo di elaborazione nervosa tanto complesso quanto essenziale, la percezione visiva.

1.2.1 L'organizzazione della retina

La retina non è un organo periferico ma una parte del sistema nervoso centrale, rimasta segregata da esso molto precocemente nel corso dello sviluppo, che ha mantenuto tuttavia le connessioni con il cervello attraverso un fascio di fibre: il nervo ottico. Originandosi dallo stesso tessuto embrionale, la sua organizzazione sinaptica ha le caratteristiche proprie di alcune strutture del sistema nervoso centrale e, come succede per la corteccia cerebrale, anche i neuroni retinici sono organizzati in strati.

La retina si colloca davanti all'epitelio pigmentato, che ricopre la superficie posteriore dell'occhio. Le cellule dell'epitelio pigmentato contengono grandi quantità di un pigmento nero, la melanina, che assorbe tutta la luce che non è stata trattenuta dalla retina, impedendo che la luce venga riflessa

di nuovo all'interno dell'occhio ed evitando quindi la distorsione dell'immagine visiva.

Gli strati dei neuroni retinici hanno una disposizione curiosa e inversa rispetto a quanto ci si potrebbe aspettare: i fotorecettori, anziché trovarsi a livello superficiale, dove i fotoni potrebbero colpirli subito, sono localizzati nella parte posteriore dell'occhio, immediatamente al davanti dell'epitelio pigmentato. La melanina ha anche il compito di aiutare la sintesi chimica del pigmento visivo dei recettori dopo che è stato sbiancato dalla luce. Tutte le altre cellule retiniche sono disposte in posizione più prossima al cristallino, anteriormente rispetto ai fotorecettori. Di conseguenza la luce deve attraversare tutti gli strati dei neuroni retinici prima di stimolare i fotorecettori. I neuroni degli strati retinici prossimali, tuttavia, sono amielinici e perciò abbastanza trasparenti, il che consente all'impulso luminoso di raggiungere i fotorecettori senza andare incontro, in maniera apprezzabile, a processi di assorbimento o di rifrazione. Nella zona della fovea (fossetta) i corpi cellulari dei neuroni degli strati prossimali della retina sono spostati lateralmente e ciò mette in grado i fotorecettori foveali di essere colpiti direttamente dalla luce e ricevere l'immagine visiva nella sua forma meno distorta possibile. Per questo motivo, a livello della fovea la visione è più nitida e massima è l'acuità visiva. Il termine acuità (dal latino *acuere*, «aguzzare») indica la capacità dell'occhio di discriminare i dettagli fini.

L'informazione sensoriale sullo stimolo luminoso viene trasmessa dai fotorecettori alle cellule bipolari e quindi alle cellule gangliari. Gli assoni delle cellule gangliari formano il nervo ottico.

Una delle caratteristiche distintive dell'elaborazione del segnale nella retina è la convergenza, mediante la quale molti neuroni fanno sinapsi su un'unica cellula postsinaptica. Una cellula bipolare può ricevere informazioni da un gruppo di 15-45 fotorecettori. A loro volta molte cellule bipolari innervano una singola cellula gangliare, in modo che l'informazione derivata da centinaia di milioni di fotorecettori viene condensata in un solo milione di

assoni che abbandonano il bulbo oculare. La convergenza è minima a livello della fovea mentre è massima ai bordi esterni della retina.

L'elaborazione retinica viene compiuta anche grazie a due ulteriori tipi cellulari: le cellule orizzontali, che fanno sinapsi sui fotorecettori e sulle cellule bipolari, e le cellule amacrine, che mettono in comunicazione le cellule bipolari con le cellule gangliari [1].

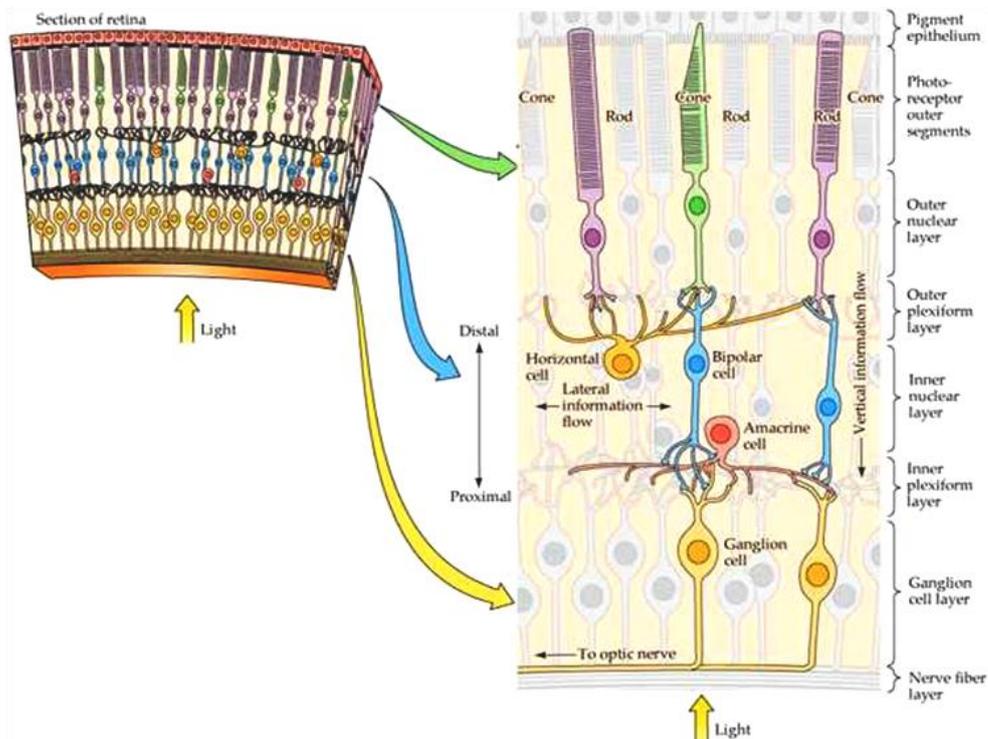


Figura 4 - Organizzazione della retina.

Si può considerare che l'informazione che attraversa la retina segua due strade: una strada diretta, dai fotorecettori alle cellule bipolari e alle cellule gangliari, e una via indiretta, nella quale cellule orizzontali possono essere interposte fra fotorecettori e cellule bipolari, e cellule amacrine fra cellule bipolari e cellule gangliari. Queste connessioni, dirette e indirette, furono già dettagliatamente descritte da Ramón y Cajal intorno al 1900. La via diretta è altamente specifica, o privata, nel senso che uno solo, o pochi, fotorecettori si connettono con una cellula bipolare, e solo una, o poche,

cellule bipolari si connettono con una cellula gangliare. La via indiretta è più diffusa, o estesa, possedendo più ampie connessioni laterali. [3]

1.2.2 I fotorecettori

Ogni tipo di recettore ha uno stimolo adeguato, cioè una particolare forma di energia alla quale è particolarmente responsivo. La specificità di un recettore per un particolare genere di stimolo è conosciuta come legge delle energie nervose specifiche. I fotorecettori retinici sono specifici per la luce.

La retina dell'uomo presenta due tipi di fotorecettori: i bastoncelli e i coni. Essi sono in totale circa 125 milioni. I bastoncelli sono più numerosi, con un rapporto di 20:1, tranne che a livello della fovea, dove altissima è la densità dei coni [1].

I bastoncelli sono efficienti in condizioni di luce scarsa (visione scotopica). Sono particolarmente sensibili alla luce e, pertanto, funzionano bene nelle condizioni di luce attenuata, quando la maggioranza degli stimoli luminosi è troppo debole per eccitare il sistema dei coni.

I coni sono responsabili della visione diurna, quando lo stimolo luminoso è di elevata intensità (visione fotopica). La visione mediata dai coni possiede un'acuità maggiore di quella mediata dai bastoncelli ed è inoltre in grado di distinguere molto meglio variazioni rapide delle immagini visive, possiede cioè una risoluzione temporale migliore. I coni assicurano anche la visione dei colori. Il sistema dei bastoncelli invece è molto più sensibile alla luce ma è totalmente acromatico.

I due tipi di fotorecettore presentano la stessa struttura di base, caratterizzata da tre principali regioni funzionali:

- 1) Un segmento esterno (cilindrico nei bastoncelli, appuntito nei coni), localizzato a livello della superficie distale della retina e in contatto con l'epitelio pigmentato, specializzato per la fototrasduzione.
- 2) Un segmento interno, localizzato in posizione più prossimale, all'interno della retina, che contiene il nucleo cellulare e gli organuli essenziali per le reazioni metaboliche come la sintesi dell'ATP e delle proteine.

- 3) Un segmento basale, cioè una terminazione sinaptica che prende contatto con le cellule bersaglio dei fotorecettori.

I segmenti esterni dei coni e dei bastoncelli contengono una elevata concentrazione di pigmenti visivi in grado di assorbire la luce. Il pigmento visivo è una molecola di piccole dimensioni, legata a una proteina di membrana di grandi dimensioni e dotata di proprietà di assorbimento della luce. Cambia forma quando viene colpita da un impulso luminoso liberando energia e innescando la generazione di un segnale elettrico. I coni e i bastoncelli presentano una grande quantità di proteine di membrana in quanto il loro segmento esterno ha sviluppato un complesso sistema di dischi membranosi sovrapposti che aumentano enormemente la superficie delle loro membrane. Questi dischi si sviluppano come una serie di invaginazioni della membrana plasmatica della cellula che finiscono col disporsi le une sulle altre. I segmenti esterni si rinnovano continuamente. Tale processo è molto rapido; nei bastoncelli infatti vengono sintetizzati approssimativamente tre dischi all'ora.

I bastoncelli posseggono quantità di fotopigmento maggiori rispetto ai coni e ciò consente loro di catturare maggiori quantità di luce. Essi hanno inoltre la capacità di amplificare i segnali luminosi molto più dei coni. Un solo fotone è in grado di risvegliare una risposta apprezzabile in un bastoncello, mentre i coni sono in grado di evocare risposte paragonabili solo dopo avere assorbito decine o centinaia di fotoni. Il sistema dei bastoncelli ha un elevato grado di convergenza, vale a dire che parecchi bastoncelli fanno sinapsi sullo stesso interneurone, costituito da una cellula bipolare. Quindi i segnali dei bastoncelli vanno a convergere sulla stessa cellula bipolare rinforzandosi reciprocamente, esaltando la risposta evocata dalla luce in ogni singolo recettore e aumentando, in ultima analisi, la capacità cerebrale di mettere in evidenza stimoli luminosi di bassa intensità. Pochi coni, al contrario, convergono sulla stessa cellula bipolare. Nella fovea, ogni cellula bipolare riceve afferenze da un solo cono.

Bastoncelli e coni non danno origine a potenziali d'azione, bensì reagiscono alla luce con variazioni graduali del loro potenziale di membrana. Le

risposte dei bastoncelli sono molto lente; la risposta dei coni è invece molto più vivace.

La maggior parte della luce che colpisce l'occhio è costituita da una miscela di onde di diversa lunghezza d'onda, la luce bianca, in cui si combinano luci di colore rosso, verde e blu.

L'occhio possiede tre sistemi di coni, sensibili a tre differenti regioni spettrali della luce. Il cervello ricava le informazioni relative ai colori degli oggetti elaborando le risposte dei tre tipi di coni. L'idea che nell'uomo la visione dei colori dipenda dalla presenza di tre diversi meccanismi dotata di larga sensibilità spettrale, ma ciascuno particolarmente sensibile a una banda dello spettro visibile, fu formulata in maniera esplicita da Thomas Young, all'inizio del diciannovesimo secolo. Ciascuna classe di coni è dotata di un pigmento diverso che vi conferisce una specifica sensibilità spettrale. Precisamente, i coni di primo tipo, i coni S, contengono un pigmento particolarmente sensibile alle lunghezze d'onda corte dello spettro visibile. I coni di secondo tipo, i coni M, sono selettivi per le lunghezze d'onda intermedie. I coni di terzo tipo, i coni L, rispondono meglio a lunghezze d'onda più lunghe. Il pigmento S ha il proprio massimo di assorbimento intorno ai 420 nm, il pigmento M vicino ai 530 nm e il pigmento L intorno ai 560 nm.

Il colore degli oggetti dipende dalle lunghezze d'onda della luce che essi riflettono e che colpiscono i fotorecettori dell'occhio. Le differenti lunghezze d'onda vengono decodificate dal cervello come colori. Quando l'occhio è colpito dalla luce, composta da più onde monocromatiche, il sistema nervoso confronta ed interpreta i segnali provenienti dai tre tipi di sensori come un nuovo colore, somma di quelli originari. I bastoncelli invece possiedono un solo tipo di pigmento, la rodopsina, e rispondono perciò in modo uniforme alle diverse lunghezze d'onda, dando contributo nullo alla visione dei colori [1].

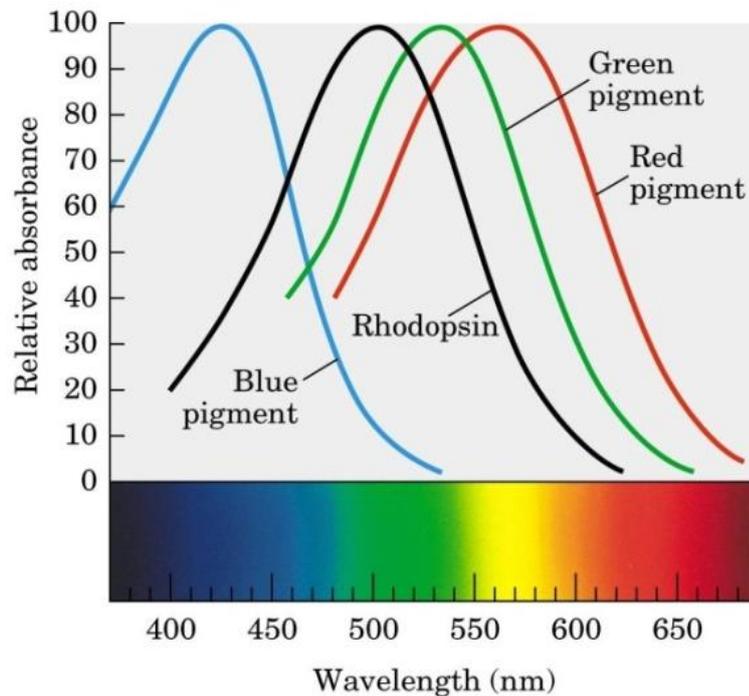


Figura 5 - Responsività spettrale dei fotorecettori retinici.

I.2.3 La fototrasduzione

L'assorbimento della luce da parte dei pigmenti visivi dei bastoncelli e dei coni dà inizio a una serie di eventi biochimici a cascata, che determina, in ultima analisi, una variazione dei flussi ionici ai capi della membrana dei fotorecettori e una conseguente variazione del loro potenziale di membrana. La molecola chiave in questa sequenza di eventi è rappresentata dal nucleotide guanosin-monofosfato 3'-5' ciclico (GMPc).

Nei bastoncelli la molecola di GMPc funge da secondo messaggero citoplasmatico in grado di convogliare l'informazione proveniente dai dischi, che galleggiano liberamente nel citoplasma e nei quali viene assorbita la luce, verso la membrana plasmatica della cellula, dove vengono modificati i flussi ionici. Nei coni, sebbene i dischi siano in continuità con la membrana plasmatica, viene impiegato GMPc, analogamente a quanto accade nei bastoncelli.

Il GMPc controlla i flussi ionici di membrana in quanto apre un canale ionico specializzato, specificamente attivato da GMPc, che determina l'ingresso nella cellula di un flusso di corrente trasportato in gran parte da

ioni Na^+ . Al buio la concentrazione di GMPc è relativamente elevata, i canali controllati dal GMPc sono in gran parte aperti e la corrente entrante che passa per questi canali mantiene i fotorecettori in uno stato di relativa depolarizzazione.

Il processo di fototrasduzione si verifica nel segmento esterno dei fotorecettori e avviene in tre stadi: (1) la luce attiva i pigmenti visivi; (2) i fotopigmenti attivati stimolano una GMPc-fosfodiesterasi che riduce la concentrazione citoplasmatica di GMPc; (3) la riduzione della concentrazione di GMPc provoca la chiusura dei canali attivati dal GMPc stesso, iperpolarizzando i fotorecettori. Verrà trattato il processo fototrasduttivo nel caso specifico dei bastoncelli, sebbene la cascata di eventi biochimici sia analoga nei coni.

I bastoncelli presentano canali ionici importanti per il passaggio di ioni attraverso la membrana del segmento esterno del fototrasduttore: canali cationici che permettono al Na^+ di entrare nel bastoncello e canali per il K^+ che consentono a questo ione di uscire.

In condizioni di buio, l'ingresso degli ioni sodio è maggiore rispetto all'uscita di ioni potassio (si parla anche di corrente al buio di sodio) in modo che il bastoncello resti depolarizzato a un potenziale medio di membrana di -40 mV, invece dei più comuni -70 mV. A questo potenziale di membrana, meno negativo di quello che caratterizza la maggior parte delle cellule, si verifica un rilascio tonico (cioè continuo) di neurotrasmettitore dal bastoncello sull'adiacente cellula bipolare. Il neurotrasmettitore coinvolto in questa via è il glutammato.

Il pigmento visivo dei bastoncelli, la rodopsina, è costituito da due componenti. Una parte proteica, l'opsina, è localizzata nella membrana dei dischi e di per sé non è in grado di assorbire la luce. La parte del complesso effettivamente deputata all'assorbimento della luce, il retinale, è un derivato della vitamina A. Il retinale può assumere diverse forme isomere, due delle quali rivestono grande importanza in fasi diverse del ciclo visivo. Nella sua forma inattiva (in assenza di luce) la rodopsina contiene il retinale come

isomero 11-*cis*, che si lega temporaneamente al sito di legame dell'opsina, a cui si adatta perfettamente.

L'attivazione della rodopsina ha inizio con l'assorbimento di un fotone. Il quanto di luce, incontrando la rodopsina, ne determina lo sbiancamento, che fa sì che il retinale assuma una configurazione diversa, da 11-*cis* a tutto-*trans*.

Questa isomerizzazione è l'evento critico che innesca l'attivazione della cascata intracellulare della fototrasduzione, determinando l'insorgenza di una variazione del potenziale di membrana, ossia di un segnale nervoso. Tale segnale, chiamato potenziale di recettore, è di tipo analogico e graduato, e consiste in una iperpolarizzazione, con conseguente riduzione del rilascio di neurotrasmettitore. L'ampiezza del potenziale di recettore aumenta all'aumentare dell'intensità dello stimolo luminoso, fino a raggiungere un massimo di iperpolarizzazione oltre il quale ulteriori incrementi dello stimolo non provocano altri effetti (saturazione). La minima intensità luminosa richiesta per attivare il recettore evocando un potenziale di recettore è chiamata soglia.

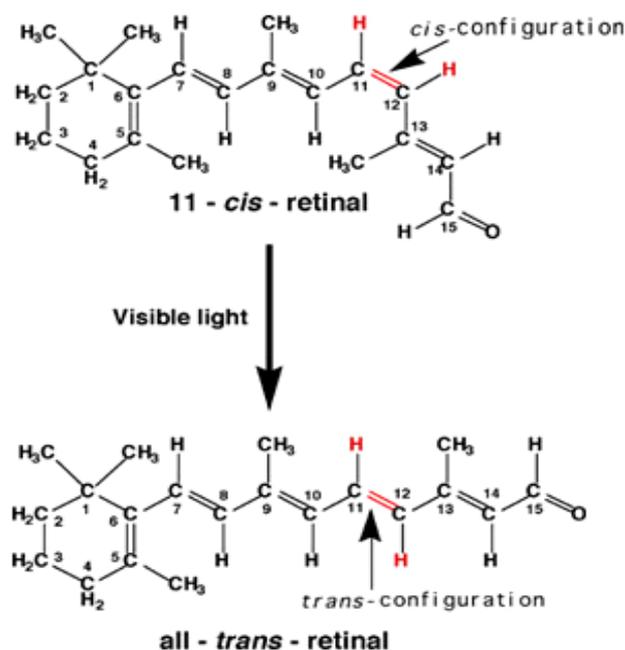


Figura 6 - Isomerizzazione del retinale: da 11-*cis* a tutto-*trans*.

Dopo aver modificato la propria conformazione, il retinale perde affinità per l'opsina, non si adegua più al corrispondente sito di legame e di conseguenza anche l'opsina va incontro, a sua volta, a un cambiamento di forma, trasformandosi in un composto semistabile, detto metarodopsina. La metarodopsina dà inizio al secondo passaggio della fototrasduzione: si scinde in opsina e retinale tutto-*trans*. Il retinale tutto-*trans* viene poi trasportato dai bastoncelli alle cellule dell'epitelio pigmentato, dove viene ridotto a retinolo tutto-*trans* (vitamina A), il precursore della sintesi del retinale 11-*cis*, il quale viene trasportato di nuovo ai bastoncelli. Il retinolo tutto-*trans* è quindi un composto chiave per il ciclo visivo e, poiché nell'uomo non viene sintetizzato, deve obbligatoriamente essere introdotto con la dieta. Una deficienza nutritiva di vitamina A determina cecità notturna e se la forma non viene curata può anche condurre alla degenerazione del segmento esterno dei fotorecettori e infine a cecità completa.

Analogamente ai bastoncelli, anche il pigmento visivo dei coni è composto da due parti: una proteina, detta opsina dei coni, e una molecola in grado di assorbire la luce che è ancora il retinale 11-*cis*. I tre pigmenti dei coni contengono diverse isoforme dell'opsina dei coni, ciascuna delle quali interagisce in modo diverso con il retinale 11-*cis* rendendolo più sensibile a una banda specifica dello spettro visibile, sensibilità che sta alla base della visione tricromatica dell'uomo.

L'attivazione delle molecole di pigmento da parte della luce determina una riduzione della concentrazione citoplasmatica del secondo messaggero GMPc. La concentrazione di GMPc viene controllata da due enzimi. Esso viene sintetizzato, a partire da GTP, dalla guanilil-ciclastasi e viene idrolizzato a 5'-GMP da una GMPc-fosfodiesterasi, che è una proteina adesa alla superficie della membrana dei dischi. La concentrazione di GMPc è sotto il controllo della luce in quanto la GMPc-fosfodiesterasi stessa è controllata dai pigmenti visivi. Nell'oscurità, l'attività della fosfodiesterasi è modesta e la quantità di GMPc è pertanto relativamente elevata. La stimolazione delle molecole di pigmento da parte della luce determina l'attivazione della

fosfodiesterasi che idrolizza il GMP riducendone la concentrazione. La fotoattivazione di una singola molecola di rodopsina può provocare l'idrolisi di più di 10^5 molecole di GMPc al secondo, generando un'amplificazione dell'effetto. Infatti ogni molecola di rodopsina diffonde attraverso la membrana dei dischi ed attiva centinaia di molecole di una proteina regolatrice, detta trasducina, ciascuna delle quali attiva a sua volta una molecola di fosfodiesterasi. Ogni molecola di fosfodiesterasi, infine, può idrolizzare più di 10^3 molecole di GMPc al secondo. La trasducina è un membro della famiglia delle proteine G trimeriche. Analogamente alle altre proteine G, l'attivazione della trasducina comporta una interazione caratteristica con i nucleotidi della guanina. Nella sua forma inattiva, la trasducina è legata strettamente a una molecola di GDP. L'interazione con una molecola di rodopsina attivata nella membrana dei dischi fa sì che la trasducina scambi il GDP con una molecola di GTP attivandosi a sua volta. La trasducina, infine, si inattiva perché, tramite l'attività GPTasica, finisce per idrolizzare il proprio GTP a GDP.

Due meccanismi pongono termine alla risposta alla luce: la trasducina si inattiva e la rodopsina, una volta attivata, va incontro a fosforilazione a opera di una protein-chinasi specifica, la opsina-chinasi, per reagire, infine, con una proteina regolatrice, chiamata arrestina, che determina rapidamente la sua inattivazione e la separazione dell'opsina dal retinale.

La diminuzione della concentrazione citoplasmatica del GMPc, innescata dalla luce, causa la chiusura dei canali GMPc-dipendenti per il Na^+ nei fotorecettori. Come risultato, l'ingresso degli ioni sodio rallenta o si ferma: questa riduzione dell'ingresso di Na^+ , associata all'uscita di K^+ che continua, causa l'iperpolarizzazione della cellula fino a -70 mV. Tutto ciò determina la diminuzione della quantità di neurotrasmettitore rilasciato sulle cellule bipolari. Una luce molto intensa chiuderà tutti i canali del Na^+ e bloccherà completamente il rilascio di glutammato, mentre una luce più moderata determinerà una risposta proporzionale all'intensità della luce stessa.

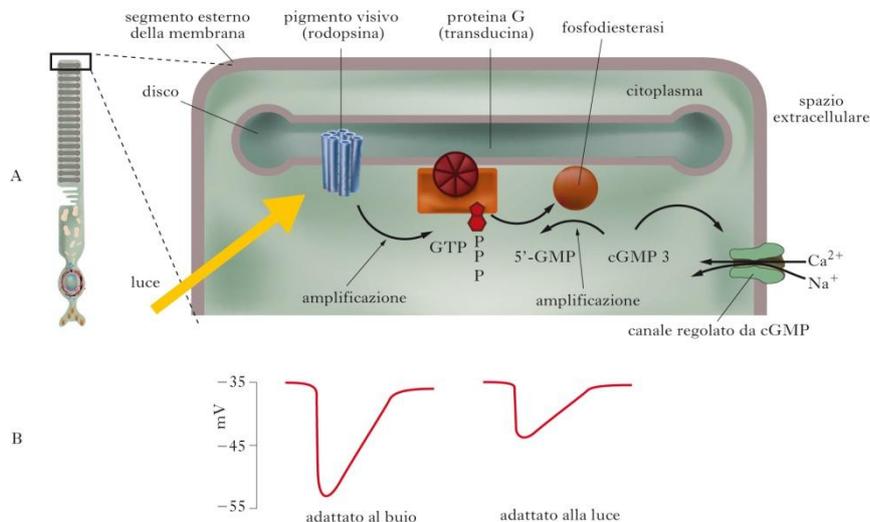


Figura 7- A) Schema della cascata biochimica della fototrasduzione, per un bastoncello; B) Risposta di un fotorecettore allo stesso stimolo luminoso, in condizioni di alta sensibilità (adattamento al buio) e di bassa sensibilità (adattamento alla luce).

Nella fase finale di recupero, il retinale attivo, separatosi dall'opsina, diffonde all'esterno del bastoncello portandosi verso l'epitelio pigmentato, dove viene ridotto in forma inattiva prima di tornare al fotorecettore per la sintesi di nuove molecole di fotopigmento attraverso la ricombinazione con l'opsina.

Il recupero della rodopsina dallo stato di sbiancamento è un processo piuttosto lento ed è un fattore molto importante nel tempo richiesto dall'occhio umano per adattarsi al nuovo livello di intensità luminosa quando ci si sposta da un ambiente con luce intensa verso il buio. La maggior durata del processo di adattamento al buio rispetto a quello di adattamento alla luce è spiegato dal fatto che sono necessari tempi lunghi per la sintesi di nuovo fotopigmento e che la sensibilità dei fotorecettori aumenta progressivamente se la luce ambientale diminuisce.

L'adattamento del sistema visivo ad una variazione di intensità luminosa dipende da una serie di processi che hanno luogo a carico della retina e di tutto l'occhio. Nel caso di adattamento alla luce, una prima risposta si ha nei coni ed è caratterizzata da un lento ritorno del potenziale di membrana ai

livelli di riposo. Una luce molto vivace provoca la chiusura di tutti i canali attivati dal GMPc, poiché iperpolarizza i coni a -70 mV, che è il potenziale di equilibrio del K^+ . In queste condizioni i coni non sono più in grado di rispondere a ulteriori incrementi dell'intensità luminosa. Se tuttavia questa elevata luminosità di fondo viene mantenuta, i coni si depolarizzano lentamente, di nuovo, raggiungendo un potenziale di membrana intermedio fra -70 e -40 mV (potenziale di riposo) e tornando ad essere capaci di iperpolarizzarsi in risposta a un successivo aumento dell'intensità di luce, mentre la forte illuminazione di fondo non risulta più abbagliante. Il secondo evento che ha luogo nei coni durante il processo di adattamento alla luce è la desensitizzazione dei recettori. Infatti, durante la prolungata esposizione a una certa luce di fondo, l'incremento minimo di luce in grado di evocare una variazione rilevabile del potenziale di riposo dei coni cresce proporzionalmente all'intensità dello stimolo luminoso stesso, in accordo con la legge di Weber- Fechner [1].

Un primo tentativo di operare una quantificazione dell'intensità delle sensazioni sotto forma di legge matematica fu messo a punto dai ricercatori Ernst Heinrich Weber e Gustav Theodor Fechner (1860), considerati padri della psicofisica, ed esprime la relazione esistente tra la portata di uno stimolo sensoriale e la percezione umana dell'intensità dello stimolo stesso. Il fenomeno secondo il quale la variazione di uno stimolo è percepita in misura minore quando l'intensità iniziale dello stimolo è elevata è descritto attraverso la seguente equazione differenziale:

$$dp = k \frac{dS}{S}$$

dove S è l'intensità dello stimolo, k è un parametro dipendente dall'unità di misura dello stimolo e p è l'intensità dello stimolo effettivamente percepita. Integrando entrambi i membri dell'equazione differenziale si ottiene

$$\int dp = k \int \frac{dS}{S}$$

da cui

$$p = k \ln S + C$$

dove C è una costante di integrazione.

È possibile determinare lo stato iniziale dello stimolo, ovvero il livello di stimolo tale per cui la percezione risulti nulla, ponendo $p = 0$, ottenendo così

$$C = -k \ln S_0$$

da cui risulta l'espressione formale della legge di Weber-Fechner:

$$p = k \ln \frac{S}{S_0}.$$

La relazione che lega l'intensità dello stimolo alla percezione dello stesso è quindi di tipo logaritmico [4].

Nell'adattamento dei coni alla luce, il lento recupero del potenziale di membrana a riposo e la desensitizzazione sono mediati da una lenta diminuzione della concentrazione di Ca^{2+} nel segmento esterno dei coni stessi, che ha luogo nel corso di un'esposizione protratta alla luce (durante l'adattamento al buio accade l'opposto).

Al buio, ioni Ca^{2+} entrano continuamente nel segmento esterno del cono attraverso i canali attivati dal GMPc. La concentrazione del calcio è mantenuta costante dall'attività di proteine carrier specializzate. Nel corso di un'illuminazione prolungata, i canali GMPc si chiudono riducendo l'ingresso di Ca^{2+} ; ciò determina una lenta diminuzione della concentrazione intracellulare di tali ioni poiché la loro estrusione continua anche in queste condizioni. Il calcio è l'inibitore della guanilil-ciclastasi, l'enzima che sintetizza il GMPc a partire da GTP. Al buio, quando la concentrazione di calcio è relativamente elevata, la guanilil-ciclastasi viene mantenuta in uno stato di parziale inibizione. La lenta diminuzione della concentrazione di calcio durante l'illuminazione sottrae l'effetto inibitorio che gli ioni Ca^{2+} esercitano sulla guanilil-ciclastasi. Di conseguenza viene sintetizzata una quantità progressivamente maggiore di GMPc, la cui concentrazione comincia ad aumentare provocando la riapertura dei canali GMPc-dipendenti, quindi la depolarizzazione dei coni.

La lenta diminuzione della concentrazione di Ca^{2+} è in parte responsabile anche della desensitizzazione dei coni durante l'adattamento alla luce: si ritiene che acceleri l'inattivazione dei pigmenti visivi, riducendo

L'attivazione della GMPc-fosfodiesterasi da parte della luce, e che limiti la sensibilità dei canali controllati dal GMPc ai gradienti di GMPc stesso [1].

I.2.4 L'output della retina

L'output della retina è dato dall'attività delle cellule gangliari, le quali, a differenza dei fotorecettori, sono in grado di generare treni di potenziali d'azione. I loro assoni vanno a formare il nervo ottico che proietta in direzione del talamo, nel corpo genicolato laterale, del collicolo superiore, del pretetto e di altri nuclei bersaglio. Fra i fotorecettori e le cellule gangliari sono interposte tre classi diverse di interneuroni: le cellule bipolari, le cellule orizzontali e le cellule amacrine. Queste cellule non si limitano a trasmettere le informazioni che ricevono dai fotorecettori ma, al contrario, combinano segnali di diversi fotorecettori in modo tale che le risposte evocate in una cellula gangliare dipendano in modo critico dai precisi pattern spaziali e temporali della luce che stimola la retina.

Le cellule gangliari non sono mai silenti, ma hanno un'attività spontanea che viene modulata dalle afferenze provenienti dai diversi interneuroni retinici. Le afferenze originano da gruppi di fotorecettori circoscriviti, localizzati in una ristretta area della retina che costituisce il *campo recettivo* della cellula gangliare stessa. Il campo recettivo di una cellula gangliare è quindi una regione retinica in cui la stimolazione luminosa dei fotorecettori determina variazioni dell'attività della cellula gangliare.

I campi recettivi delle cellule gangliari possiedono due caratteristiche importanti. In primo luogo, essi sono approssimativamente circolari. Secondariamente, ogni campo recettivo è diviso in due parti: una zona circolare interna, detta centro del campo recettivo, e una rimanente porzione esterna, detta periferia. Le cellule gangliari rispondono in modo ottimale alle differenze di illuminazione fra centro e periferia.

Due classi di cellule gangliari possono essere distinte sulla base della risposta ad un piccolo punto di luce applicato al centro del loro campo recettivo. Le cellule gangliari centro-ON vengono eccitate in risposta ad un fascio di luce diretto al centro del campo recettivo. Le cellule gangliari

centro-OFF vengono inibite da uno stimolo analogo mentre rispondono energicamente se la luce è più intensa nella zona periferica. Le cellule gangliari sono sensibili ai contrasti di luminosità fra centro e periferia del campo recettivo, mentre l'illuminazione diffusa produce scarso effetto sull'attività delle stesse perché la luce, invadendo uniformemente il campo recettivo, provoca la sovrapposizione delle risposte on e off della cellula gangliare. Da questo risulta che la retina utilizza il contrasto anziché l'intensità assoluta della luce per riconoscere gli oggetti nell'ambiente.

Il numero delle cellule gangliari centro-ON e centro-OFF è approssimativamente uguale ed ogni fotorecettore invia i propri segnali d'uscita a cellule gangliari di entrambi i tipi. In tal modo, le cellule gangliari vanno a costituire due vie in parallelo per l'elaborazione dell'informazione visiva. Inoltre le dimensioni dei campi recettivi delle cellule gangliari variano notevolmente da una regione della retina all'altra. Nella fovea dei primati, dove massima è l'acuità visiva, i campi recettivi sono molto piccoli, perché ogni cellula gangliare riceve informazioni da pochissimi fotorecettori, mentre alla periferia, dove l'acuità diminuisce, i campi sono molto più grandi.

Il rilevamento dei contrasti inizia nella retina e i segnali emessi dai fotorecettori vengono elaborati in periferia prima di essere inviati ai centri cerebrali per minimizzare gli errori di trasmissione. Durante la trasmissione attraverso le diverse stazioni relè, i segnali tendono ad essere leggermente distorti. Se due fotorecettori sono illuminati da una luce che ha intensità solo debolmente diversa, anche le loro risposte saranno solo debolmente diverse ed errori nella trasmissione potrebbero impedire ai centri superiori di rilevarne la differenza. Le cellule gangliari della retina garantiscono la riduzione della distorsione del segnale. La frequenza di scarica delle cellule gangliari fornisce una misura delle differenze di illuminazione presenti fra centro e periferia e il segnale che viene trasmesso ai centri superiori è proporzionale alle variazioni di luminosità che interessano il campo recettivo.

Il fatto che l'analisi dell'informazione sia separata in due vie parallele, rispettivamente centro-ON e centro-OFF, migliora le prestazioni del sistema visivo, poiché ogni tipo di cellula gangliare segnala in maniera ottimale sia rapidi aumenti che rapide diminuzioni del livello di illuminazione. Le cellule gangliari centro-ON scaricano a bassa frequenza in condizioni di luce attenuata. Un aumento repentino della loro frequenza di scarica indicherà pertanto un incremento rapido dell'intensità luminosa al centro del loro campo recettivo. Per converso, le cellule centro-OFF presentano una bassa frequenza di scarica quando vengono esposte alla luce. Un aumento rapido della loro frequenza di scarica segnerà una diminuzione repentina di illuminazione al centro del loro campo recettivo.

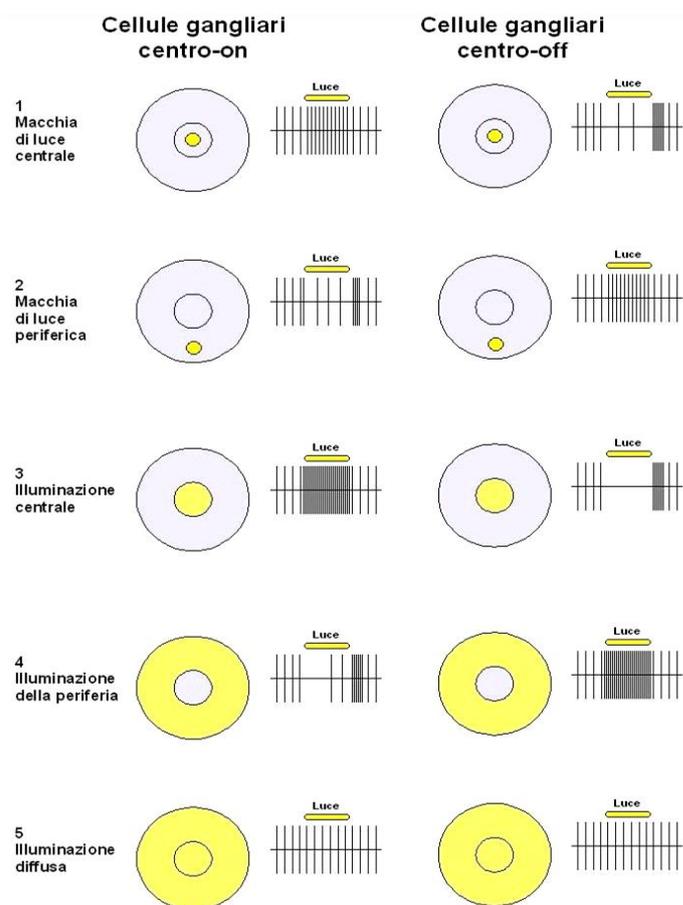


Figura 8 - Risposte prodotte per uno stesso stimolo luminoso che investe il campo recettivo di una cellula gangliare centro-ON e di una centro-OFF. La risposta di ogni cellula gangliare è valutata in termini di potenziali d'azione al secondo

Oltre ad elaborare le informazioni relative al contrasto e alle rapide variazioni di illuminazione, il sistema visivo analizza anche altri aspetti delle immagini, come il colore, la forma e il movimento. Ogni zona della retina possiede sottogruppi diversi di cellule gangliari su cui vanno a convergere separatamente ed in parallelo segnali provenienti dai medesimi fotorecettori. La maggior parte delle cellule gangliari dei primati ricade in due categorie: le cellule M (magnocellulari) e le cellule P (parvocellulari), entrambe contenenti sia cellule-ON che centro-OFF.

Le cellule M sono contraddistinte da corpi grossi ed esteso albero dendritico, hanno campi recettivi molto grandi e sono deputate all'analisi delle caratteristiche globali dello stimolo, rispondendo bene a input rappresentati da grandi oggetti in movimento. Le cellule P sono più piccole e hanno campi recettivi più ridotti, sono selettivamente sensibili a frequenze d'onda specifiche e la loro funzione è legata all'analisi dei colori, delle forme e dei minuti dettagli delle immagini visive.

L'informazione visiva trasmessa dai fotorecettori alle cellule gangliari percorre il circuito retinico attraverso due possibili vie. Nello specifico, i coni, situati nel centro del campo recettivo di una cellula gangliare, entrano in contatto sinaptico con le cellule bipolari che, a loro volta, trasmettono il segnale direttamente alle cellule gangliari. I segnali provenienti dai coni localizzati nella periferia del campo recettivo vengono convogliati alle cellule gangliari attraverso le cellule bipolari, grazie alle cellule orizzontali e amacrine.

Le cellule orizzontali possiedono alberi dendritici molto estesi e trasmettono alle cellule bipolari informazioni inviate da coni localizzati a distanza. Le cellule amacrine hanno un'enorme varietà di forme ma hanno tutte in comune la posizione di interconnessione fra cellule bipolari e cellule gangliari della retina.

Analogamente alle cellule gangliari, anche le cellule bipolari hanno campi recettivi con un'organizzazione basata sull'antagonismo centro-periferia. Quando si attivano i coni localizzati nel centro del campo recettivo, le cellule bipolari di tipo centro-ON si depolarizzano mentre quelle di tipo

centro-OFF si iperpolarizzano. Quando si attivano invece i coni posti alla periferia del campo recettivo la risposta della cellula bipolare è opposta rispetto a quella evocata dall'illuminazione del centro. Le proprietà dei campi recettivi delle cellule bipolari riflettono in gran parte quelle dei neuroni gangliari.

Il neurotrasmettitore liberato dai coni, il glutammato, inibisce (iperpolarizza) le cellule bipolari centro-ON mentre eccita (depolarizza) le cellule bipolari centro-OFF.

Nell'oscurità, i coni sono depolarizzati (intorno a -40 mV) in modo che i canali Ca^{2+} voltaggio-dipendenti situati nelle terminazioni sinaptiche sono per lo più aperti e lasciano entrare ioni calcio innescando la liberazione di glutammato. Il costante rilascio di neurotrasmettitore mantiene la cellula bipolare centro-ON in uno stato di iperpolarizzazione. Quando il cono viene illuminato, esso si iperpolarizza determinando la chiusura dei canali Ca^{2+} voltaggio-dipendenti. Ciò riduce l'ingresso di calcio e diminuisce la quantità di glutammato liberato, perciò la cellula bipolare si depolarizza. Al contrario, al buio, i coni mantengono le cellule bipolari centro-OFF in uno stato di parziale depolarizzazione, mentre, quando vengono illuminati, riducono il rilascio di glutammato e le iperpolarizzano.

I coni localizzati alla periferia del campo recettivo di una cellula bipolare stabiliscono sinapsi con le cellule orizzontali. Le cellule orizzontali svolgono funzioni di modulazione, mediando interazioni di inibizione laterale fra fotorecettori e cellule bipolari. Esse non attuano connessioni sinaptiche dirette con le cellule bipolari; vanno altresì in contatto con i coni che controllano il centro del campo recettivo della medesima cellula bipolare (centro-ON). Quando la periferia viene illuminata, la cellula orizzontale depolarizza il cono posto al centro del campo recettivo; ciò fa sì che la cellula bipolare si iperpolarizzi [1], [3].

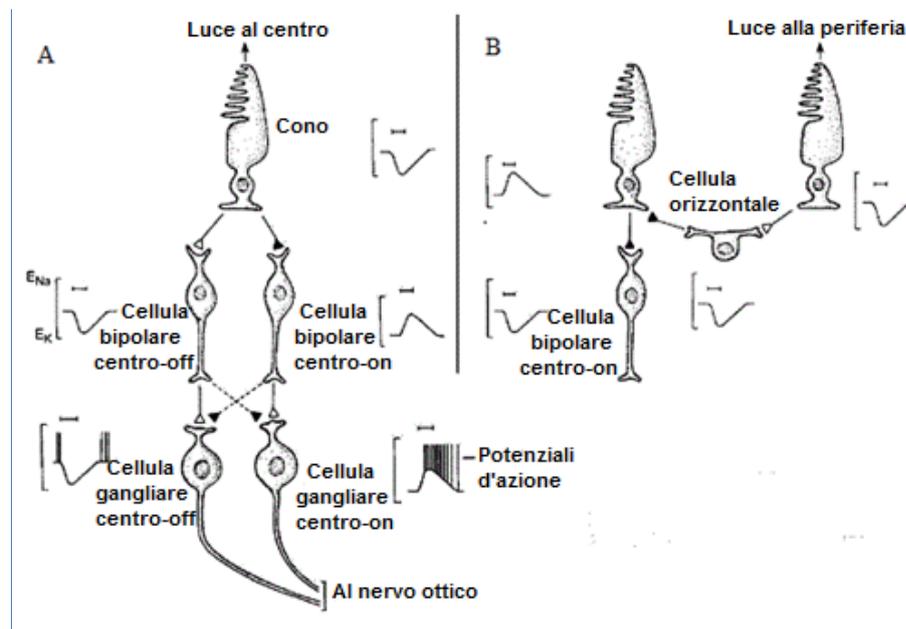


Figura 9 - A) Le cellule bipolari centro-ON e centro-OFF formano due vie parallele per l'elaborazione del segnale che divergono da uno stesso cono;
 B) I segnali provenienti dai coni localizzati alla periferia del campo recettivo di una cellula bipolare vengono mediati dalle cellule orizzontali.

I.3 LE VIE VISIVE CENTRALI

Quando il segnale visivo lascia le cellule gangliari, viaggia lungo il nervo ottico per raggiungere il sistema nervoso centrale ed essere ulteriormente elaborato.

Il campo visivo è la parte del mondo esterno che viene vista dai due occhi in assenza di movimenti del capo.

Rispetto alla linea mediana, la superficie retinica può essere suddivisa in una emiretina nasale, che sta medialmente alla fovea, ed in una emiretina temporale, situata lateralmente a questa. Ogni emiretina, a sua volta, può essere distinta in una quadrante ventrale (o inferiore) e in un quadrante dorsale (o superiore).

Quando le fovee di entrambi gli occhi fissano un solo punto nello spazio, l'emicampo visivo sinistro proietta le proprie immagini sull'emiretina nasale dell'occhio sinistro e sull'emiretina temporale dell'occhio destro.

L'emicampo visivo destro proietta invece le proprie immagini sull'emiretina nasale dell'occhio destro e sull'emiretina temporale dell'occhio sinistro.

Gli assoni delle cellule gangliari retiniche confluiscono nel disco ottico, dove divengono mielinici e vanno a formare, bilateralmente, i nervi ottici. A livello del chiasma ottico le fibre delle metà nasali di ogni retina si incrociano e proiettano all'emisfero cerebrale controlaterale. Le fibre provenienti dalle emiretine temporali, al contrario, non si incrociano. Per via di tale disposizione, gli assoni provenienti dalle metà sinistre di ogni retina (l'emiretina temporale dell'occhio sinistro e l'emiretina nasale di quello destro) convergono nel tratto ottico sinistro, che, in questo modo, contiene una rappresentazione completa dell'emicampo visivo destro. L'informazione che deriva dall'emicampo visivo destro viene analizzata quindi dal lato sinistro del cervello e, viceversa, l'informazione raccolta dalla parte sinistra del campo visivo raggiunge l'emisfero cerebrale destro.

L'immagine visiva focalizzata sulla retina risulta invertita: la metà superiore del campo visivo viene proiettata, attraverso il cristallino, sulla metà ventrale della retina, mentre la metà inferiore sulla metà dorsale. L'elaborazione nervosa dell'informazione visiva compiuta dall'encefalo capovolge nuovamente l'immagine in modo che la si percepisca raddrizzata. I tratti ottici afferiscono a tre principali stazioni sottocorticali: il pretetto, il collicolo superiore e il corpo genicolato laterale.

La zona pretettale è formata da un gruppo di nuclei posti rostralmente rispetto al collicolo superiore, nel punto in cui il mesencefalo si continua con il talamo. Il pretetto è importante perché è il principale responsabile delle risposte vegetative connesse con l'apparato visivo, come i riflessi di costrizione e dilatazione della pupilla, mediati rispettivamente dal sistema parasimpatico e simpatico. Il pretetto controlla anche il riflesso di puntamento, utile nel rilevare perturbamenti nel campo visivo, attorno ad un punto che l'occhio sta fissando.

Il collicolo superiore è una struttura mesencefalica costituita da più strati. Le informazioni visive si scaricano sugli strati superficiali, i quali proiettano a larghe aree della corteccia cerebrale. Negli strati profondi le afferenze visive

si mettono in registro con afferenze provenienti da altre modalità sensoriali, come udito e tatto: si tratta di un sistema di integrazione multisensoriale. La mappa retinotopica superficiale è disposta in modo da essere congruente alla mappa somatosensitiva e uditiva presente negli strati più profondi. Le informazioni veicolate dal tratto ottico trovano inoltre nel collicolo superiore una stazione importante per evocare una serie di movimenti oculari strettamente connessi con l'attività dei centri superiori.

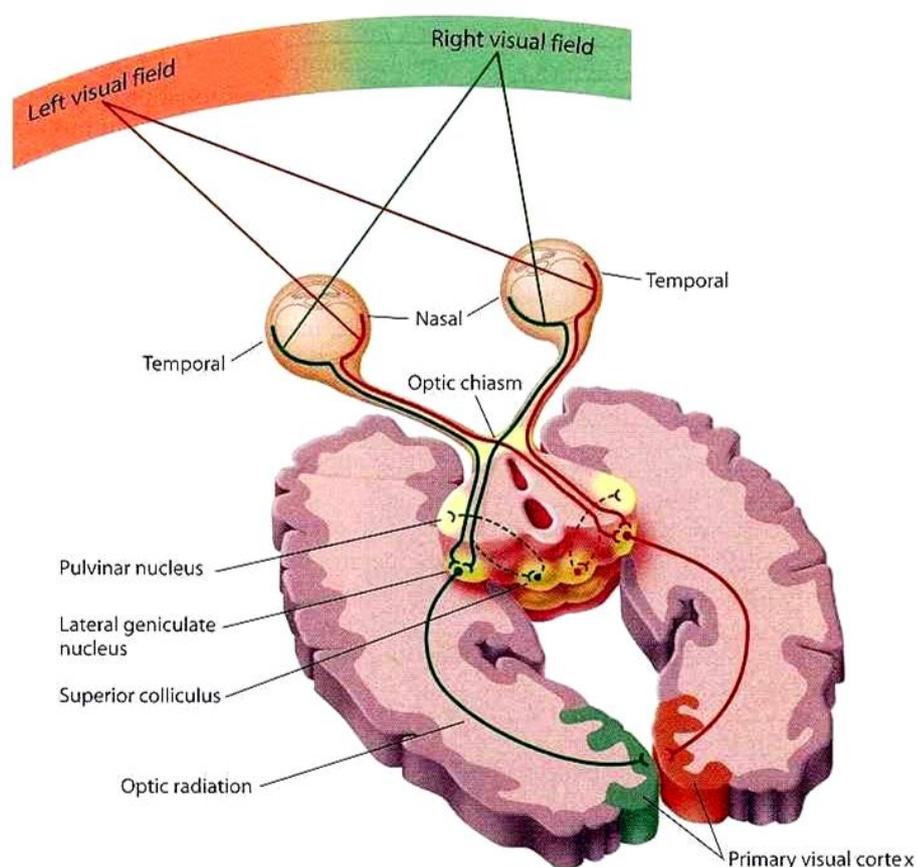


Figura 10 - Le vie visive centrali.

Il corpo genicolato laterale (CGL) è la principale stazione talamica di trasmissione delle informazioni visive destinate alla corteccia visiva. Le cellule gangliari della retina raggiungono i sei diversi strati del corpo genicolato laterale, sul quale viene a costituirsi una rappresentazione retinotopica della metà controlaterale del campo visivo. La superficie della

retina non è rappresentata, tuttavia, in modo spazialmente uniforme nel corpo genicolato laterale. La fovea, che è la regione retinica dove maggiore è la densità delle cellule gangliari, occupa un'area sulla rappresentazione retinotopica più estesa rispetto alla periferia.

Gli assoni delle cellule gangliari retiniche M e P restano separati anche nel CGL. I due strati più ventrali del CGL sono detti strati magnocellulari perché ricevono afferenze dalle cellule gangliari M, mentre i restanti quattro strati più dorsali, ricevendo afferenze dalle cellule gangliari P, sono detti parvicellulari. Gli strati magnocellulari e parvicellulari proiettano a loro volta a strati diversi della corteccia visiva primaria. Questa singolare separazione anatomica di cellule gangliari retiniche, di cellule del CGL e dei neuroni corticali visivi corrisponde all'esistenza di due vie parallele, distinte anche dal punto di vista funzionale: il canale M, preposto all'analisi del movimento, e il canale P deputato all'analisi della forma e del colore della scena visiva.

Ogni strato del nucleo riceve afferenze da un solo occhio: le fibre che provengono dall'emiretina nasale controlaterale prendono contatto con gli strati 1, 4 e 6, quelle che originano dall'emiretina temporale ipsilaterale terminano negli strati 2, 3 e 5. I campi recettivi dei neuroni del CGL hanno un'organizzazione analoga ai campi recettivi delle cellule gangliari retiniche.

La prima stazione di ritrasmissione delle vie visive in cui le proprietà dei campi recettivi cellulari cambiano in maniera significativa rispetto alle cellule della retina è la corteccia visiva primaria (V1), nel lobo occipitale. Dal CGL l'informazione visiva raggiunge l'area della corteccia intorno alla scissura calcarina, attraverso la via genicolo-calcarina o radiazione ottica.

La corteccia visiva primaria, o area 17 di Brodmann, è detta *corteccia striata* e riceve informazioni soltanto dalla metà controlaterale del campo visivo. Nell'uomo, ha uno spessore di 2 mm ed è composta da sei strati. Il principale strato d'ingresso delle fibre che arrivano dal CGL è lo strato IV, ulteriormente suddiviso in quattro sottostrati: IVA, IVB, IVC α e IVC β . La separazione delle vie magnocellulare e parvicellulare continua a mantenersi

anche a questo livello di elaborazione: gli assoni delle cellule M termina principalmente nella sottolamina IVC α , gli assoni delle cellule P terminano soprattutto nella sottolamina IVC β .

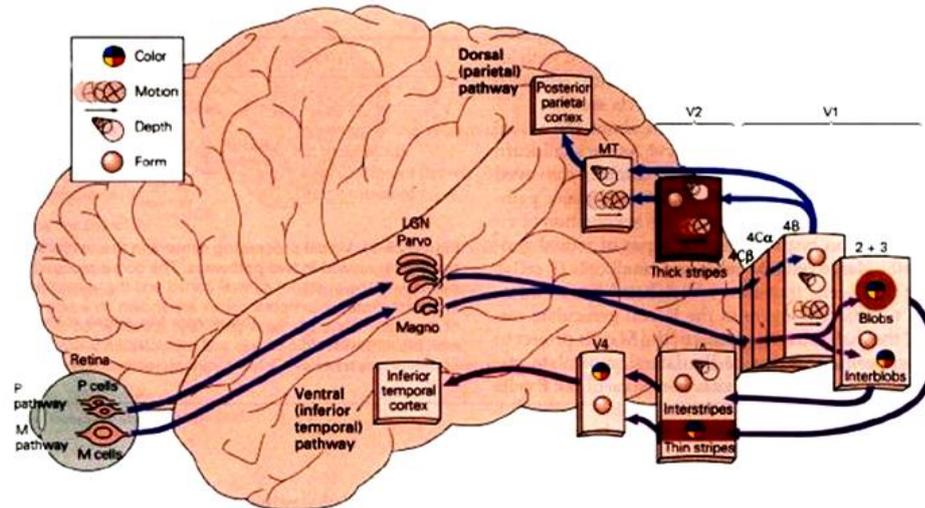


Figura 11 - Analisi in parallelo delle diverse caratteristiche dello stimolo visivo: sistema magnocellulare e sistema parvi cellulare

Le vie di propagazione visiva M e P decorrono distintamente dalla retina alla corteccia striata, portando due contributi funzionali diversi. La via magnocellulare (ventrale), o via del DOVE, è essenziale per l'analisi delle relazioni spaziali fra gli oggetti, della profondità, del movimento. Dalla V1, la via magnocellulare proietta alla corteccia parietale posteriore. La via parvicellulare (dorsale) è associata al riconoscimento delle forme e dei colori e all'analisi dell'orientamento dei margini degli oggetti. Dalla V1, la via parvicellulare giunge alla corteccia inferotemporale.

Gli assoni di un terzo gruppo di cellule, localizzate nella zona intralaminare del CGL, terminano negli strati II e III, dove innervano formazioni cellulari, chiamate blob, che trasportano informazioni sui colori.

La corteccia contiene due classi fondamentali di neuroni. Le cellule piramidali sono grossi neuroni di proiezione, dotati di lunghi assoni provvisti di spine. Le cellule non piramidali sono piccoli interneuroni stellati locali, che possono essere forniti di spine (cellule stellate spinose) o privi di spine (cellule stellate lisce). Sia le cellule piramidali che le cellule stellate

spinose sono eccitatorie e come neurotrasmettitore usano glutammato o aspartato. Le cellule stellate lisce sono invece inibitorie e contengono per lo più acido γ -aminobutirrico (GABA). Le cellule stellate spinose distribuiscono le informazioni ricevute dal CGL alla corteccia, mentre le cellule piramidali, attraverso collaterali dei propri assoni, integrano l'attività delle cellule degli strati soprastanti e sottostanti di V1.

Le cellule della corteccia visiva mostrano proprietà più complesse delle altre stazioni visive, poiché non rispondono più a piccole macchie di luce. Hubel e Wiesel, neuroscienziati che hanno studiato a lungo il funzionamento della corteccia visiva primaria, le hanno suddivise in due categorie: le cellule semplici e le cellule complesse.

Le cellule semplici forniscono la loro miglior risposta a stimoli di forma rettilinea, come sbarrette luminose, con orientamento caratteristico, in un punto specifico del campo recettivo. Presentano campi recettivi allungati, in cui si distinguono zone eccitatorie e zone inibitorie.

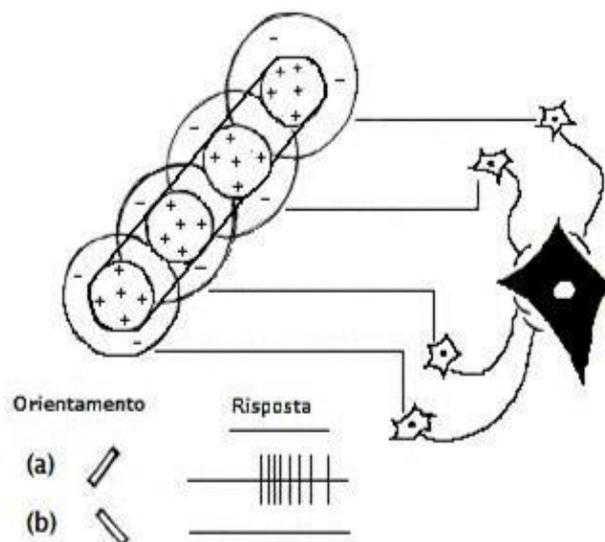


Figura 12 - Cellula semplice selettiva per l'orientamento. a) Risposta eccitatoria alla sbarretta luminosa con orientamento specifico; b) Risposta nulla alla sbarretta luminosa con diverso orientamento.

Le cellule complesse sono stimulate da sbarrette luminose ad orientamento specifico, in qualsiasi punto del campo recettivo o in movimento in una

determinata direzione. I campi recettivi delle cellule complesse hanno dimensioni maggiori rispetto a quelli delle cellule semplici e non contengono alcuna distinzione fra aree eccitatorie ed inibitorie. Per alcune cellule complesse il movimento di un oggetto nel campo recettivo rappresenta uno stimolo particolarmente efficace. Nell'esplorazione della scena visiva gli occhi si muovono da un punto all'altro molto velocemente, compiendo movimenti saccadici che facilitano la visione degli oggetti fermi, e microsaccadi, movimenti oculari più piccoli per l'analisi dei singoli punti. Le cellule sensibili al movimento sono indispensabili per la rilevazione di oggetti in movimento e per la percezione di oggetti statici mediante saccadi. Ad ogni livello del sistema visivo, ogni cellula ha una capacità di elaborazione maggiore rispetto ai livelli inferiori. Ad ogni stazione della via afferente le proprietà dello stimolo capace di attivare una cellula divengono sempre più specifiche. Le cellule gangliari della retina e del corpo genicolato rispondono essenzialmente ai contrasti di luminosità. Queste informazioni elementari vengono quindi rimodellate dalle cellule semplici e complesse della corteccia, tramite le proprietà di eccitamento dei corrispondenti campi recettivi rettilinei, in segmenti netti e margini precisi: un passaggio importante per l'analisi delle sagome degli oggetti e per la formazione dell' "abbozzo primitivo" dell'immagine, cioè la rappresentazione approssimativa e bidimensionale della forma e del contorno dello stimolo.

La proprietà caratteristica dell'architettura della corteccia visiva è l'organizzazione colonnare: raggruppamenti di neuroni corticali disposti anatomicamente in colonne, raccolgono l'informazione visiva, che fino al corpo genicolato laterale era stata trasmessa in canali separati, in moduli funzionali deputati all'elaborazione degli stimoli provenienti da zone specifiche del campo visivo.

Le colonne si distribuiscono dalla pia madre alla sostanza bianca. Esse contengono tutte le cellule, semplici o complesse, con campo recettivo che risponde allo stesso orientamento, pertanto si parla di colonne di orientamento. Tra colonne di orientamento adiacenti si trovano spesso le

cellule blob, che rispondono selettivamente agli stimoli colorati e sono caratterizzati da campi recettivi privi di orientamento specifico. Esiste un terzo tipo di sistema colonnare, a disposizione alternata, che analizza le afferenze che provengono dall'occhio ipsilaterale o controlaterale: il sistema a dominanza oculare.

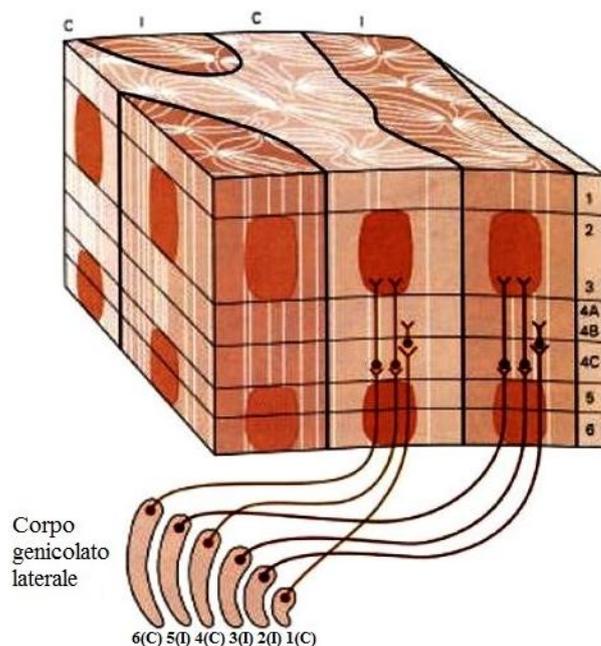


Figura 13 - *Organizzazione colonnare della corteccia visiva primaria.*

Hubel e Wiesel hanno chiamato ipercolonna la struttura di tessuto corticale nella quale sono riprodotti tutti i possibili orientamenti. L'ipercolonna è un raggruppamento di cellule corticali che unisce i due campi visivi e possiede le proprietà adatte per analizzare oggetti di tutti gli orientamenti in singole zone del campo visivo.

L'intera corteccia visiva è rappresentabile come una successione modulare di colonne di orientamento e colonne di dominanza oculare che si ripetono regolarmente e con precisione. Il sistema colonnare, sviluppato in verticale, interseca un ulteriore sistema di connessioni disposto orizzontalmente. Le cellule delle colonne che svolgono funzioni simili sono in rapporto fra loro tramite connessioni orizzontali, all'interno dello stesso strato. Queste connessioni integrano informazioni che interessano la corteccia per

un'estensione di diversi millimetri, in modo che una cellula può essere influenzata da stimoli che cadono al di fuori del proprio campo recettivo. Si ritiene che l' "effetto del contesto", secondo il quale la valutazione dell'oggetto dipende dal contesto generale di cui esso fa parte, sia mediato da suddette connessioni orizzontali presenti nella corteccia visiva.

Le efferenze della corteccia visiva primaria nascono da tutti gli strati corticali, eccetto lo strato IVC. Gli assoni degli strati soprastanti lo strato IVC proiettano ad altre aree corticali; gli assoni degli strati sottostanti proiettano ad aree sottocorticali. Le cellule degli strati II e III raggiungono le aree corticali visive superiori, come quelle dell'area 18 di Brodmann (V2, V3 e V4). Le cellule di questi strati, attraverso il corpo calloso, formano altresì connessioni con le aree corticali anatomicamente corrispondenti all'emisfero cerebrale contro laterale. Le cellule dello strato IVB inviano collaterali al lobo medio temporale (V5 o MT). Le cellule dello strato V mandano assoni al collicolo superiore, al ponte e al pulvinar. Le cellule dello strato VI proiettano al corpo genicolato laterale e al claustrum. Ognuna di queste proiezioni ha una funzione specifica. Ad esempio, pulvinar e claustrum sono implicati nei processi di controllo dell'attenzione visiva, che dirigono selettivamente l'attenzione sulle caratteristiche specifiche di un oggetto, mettendone in rilievo gli elementi segregati su mappe corticali diverse [1], [3].

II. LE PATOLOGIE DELLA RETINA

Le patologie neurodegenerative della retina sono la principale causa della perdita della funzionalità visiva. La visione è la manifestazione di complessi eventi neurosensoriali che nascono nella retina, il sottile tessuto nervoso fotosensibile preposto alla trasformazione dei quanti di luce in segnali elettrici. Disfunzioni della retina associate alla degenerazione dei fotorecettori compromettono l'attività di fototrasduzione dello stimolo luminoso, alterando la trasmissione dell'informazione nervosa ai centri superiori e danneggiando l'evocazione della sensazione visiva.

Secondo l'Organizzazione mondiale della sanità (WHO 2010) sulla Terra vivono 285 milioni di persone con handicap visivo grave: 39 milioni sono i ciechi e 246 milioni sono gli ipovedenti. Solo in Italia, l'ISTAT stima che vi siano 362 mila ciechi e che siano oltre un milione gli ipovedenti [16].

Le definizioni legali della riduzione della funzione visiva sono legate principalmente all'acutezza visiva o visus, cioè la capacità dell'occhio di distinguere i più fini particolari di un oggetto che sta fissando. L'OMS propone la distinzione fra cecità e ipovisione: un soggetto è cieco quando l'acuità visiva corretta nell'occhio migliore è inferiore a 1/20, mentre è considerato ipovedente quando essa è compresa tra 3/10 e 1/20. In Italia il concetto legale di cecità-ipo visione è stato ridefinito con la legge 3 aprile 2001, n.138: "Classificazione e quantificazione delle minoranze visive e norme in materia di accertamenti oculistici". Le innovazioni introdotte da questa legge consistono nel prendere in esame, per la valutazione del danno visivo, non solo lo stato della visione centrale ma anche lo stato della visione periferica o campo visivo, la quantità di spazio che l'occhio percepisce quando fissa un punto. La riduzione del campo visivo è invalidante tanto quanto la riduzione del visus, in quanto limita la capacità di controllo dello spazio circostante. La legge precedente quantificava la menomazione visiva sulla base di un solo parametro, il visus, risultando

perciò incompleta. La nuova legge stabilisce una classificazione più ampia delle disabilità visive distinguendo i ciechi in totali e parziali e gli ipovedenti in gravi, medio-gravi e lievi [6].

La perdita o la forte riduzione della capacità visiva cambia in maniera profonda e irreversibile la vita dell'individuo e rappresenta una condizione limitante per l'autonomia personale e le relazioni interpersonali, compromettendo lo svolgimento delle normali attività quotidiane e comportando ingenti difficoltà nel rapporto con l'ambiente sociale.

Molteplici sono le cause che portano all'insorgere di deficit visivo e possono essere di natura sia genetica, sia ambientale. Fra le malattie neurodegenerative che colpiscono la retina, la retinite pigmentosa (RP) appartiene al gruppo delle patologie ereditarie; la degenerazione maculare legata all'età (AMD) è invece una forma di maculopatia acquisita con l'invecchiamento. Caratteristica comune ad entrambe le malattie è la perdita della funzionalità delle cellule fotosensibili retiniche e la progressiva riduzione delle capacità visive che, nei casi peggiori, può condurre alla cecità.

Per diagnosticare la retinopatia e osservarne il decorso, l'oftalmologia si avvale di accurati strumenti e tecniche di indagine, volti a esplorare il tessuto e la zona della retina interessati.

II.1 TEST STRUMENTALI PER LA DIAGNOSI DELLE RETINOPATIE

La diagnosi delle patologie che colpiscono lo strato dei fotorecettori della retina, indicata per riconoscere o confermare, nello specifico, la presenza di retinite pigmentosa e degenerazione maculare senile, e per sorvegliarne l'evoluzione, comprende le più precise metodiche strumentali. L'esame del fondo oculare è fondamentale per valutare lo stato anatomico-funzionale della retina, il controllo del visus rileva l'acutezza visiva nella porzione centrale della retina, il test del campo visivo misura la differente sensibilità

retinica alla luce nel perimetro del campo visivo, gli accertamenti fondati sulle tecniche di “imaging”, come la tomografia a coerenza ottica (OCT), consentono di studiare in modo dettagliato le sezioni ottiche della retina, l’elettroretinografia, l’elettro-oculogramma e il test dei potenziali visivi evocati sono rispettivamente espressione dell’attività bioelettrica delle cellule della retina, dell’epitelio pigmentato e delle vie ottiche.

II.1.1 L’esame del fondo oculare

L’esame del fondo oculare ha lo scopo di visualizzare le strutture interne del bulbo oculare, ed in particolare la retina e la testa del nervo ottico. Consente di diagnosticare malattie che comportano conseguenze sull’apparato circolatorio, come il diabete mellito, e di ricercare la presenza di caratteristiche macchie sulla superficie retinica, che indicano depositi di pigmento in RP o drusen, formazioni degenerative rotondeggianti, in AMD.



Figura 14 - A) Immagine del fondo oculare in presenza di retinite pigmentosa. B) Immagine del fondo oculare in presenza di degenerazione maculare legata all’età.

Per l’esecuzione dell’esame è necessario utilizzare un oftalmoscopio oppure, in alternativa, una lampada a fessura con delle apposite lenti. Con l’oftalmoscopio diretto la luce viene proiettata direttamente nell’occhio del soggetto esaminato. Nell’oftalmoscopia indiretta l’esaminatore si viene invece a trovare tra la sorgente luminosa e l’esaminato. In questo modo si ottiene il tipico riflesso rosso della retina, che viene messo a fuoco grazie all’utilizzo di speciali lenti d’ingrandimento. La lampada a fessura permette

l'esame del segmento posteriore dell'occhio ricorrendo a delle lenti addizionali per la visualizzazione della retina e del corpo vitreo. L'oftalmoscopio a scansione laser (SLO) è infine uno strumento utilizzato per la valutazione del fondo della retina, progettato per catturare le immagini degli strati retinici simultaneamente a immagini confocali del fondo, permettendo la riproduzione di immagini 3D.

II.1.2 *L'esame del visus e l'esame del campo visivo*

L'esame del visus o dell'acutezza visiva è l'esame funzionale che consente di valutare la capacità dell'occhio di discriminare dettagli spaziali. Consiste nella lettura di caratteri di varia grandezza, rappresentati su tavole illuminate, dette ottotipi. La distanza di osservazione degli ottotipi viene fissata per convenzione a 3 o 5 metri nell'esame del visus da lontano, e a 3 cm nell'esame del visus da vicino.

L'esame del campo visivo (o perimetria) è una metodica diagnostica che permette di testare la sensibilità retinica e rilevare gli eventuali difetti centrali o periferici. La perimetria è specifica nel mappare e quantificare il campo visivo, misurando i valori di sensibilità luminosa di aree della retina considerate sufficientemente rappresentative, ai fini clinici, dell'intera struttura retinica. Il campo visivo viene analizzato mediante strumenti computerizzati sofisticati, denominati perimetri, che acquisiscono le risposte del soggetto a spot luminosi di intensità variabile, proiettati in differenti punti del campo visivo di entrambi gli occhi.

II.1.3 *Gli esami elettro-funzionali*

L'esplorazione elettrofisiologica della retina e delle vie ottiche fino alle aree corticali occipitali avviene tramite esami obiettivi: l'elettro-oculogramma, l'elettroretinogramma e i potenziali visivi evocati.

L'elettro-oculogramma (EOG) consente di esaminare il funzionamento dell'epitelio pigmentato, lo strato di cellule situato tra la retina e la coroide, e si basa sulla misurazione del potenziale di riposo corneo-retinico. Tra la cornea ed il polo posteriore dell'occhio esiste una differenza di potenziale:

si parla di bipolo oculare, con cornea positiva e retina negativa. La differenza di potenziale varia in funzione della luce entrante; è registrabile applicando un elettrodo al lato oculare interno ed uno al lato esterno ed è indotta da spostamenti del globo oculare da un lato all'altro. L'esame misura le variazioni di campo elettrico che si originano a livello dei tessuti perioculari per l'avvicinarsi e l'allontanarsi da questi dei poli oculari e valuta la risposta complessiva dell'epitelio pigmentato, dipendente dall'intensità della luce. In caso di degenerazione maculare correlata all'età, è di notevole interesse poter analizzare in modo mirato le funzioni dell'epitelio pigmentato retinico, in diversi punti della macula, mediante EOG.

L'elettroretinogramma (ERG) è la risposta elettrica della retina ad uno stimolo luminoso ed è la rappresentazione grafica dell'interazione dei potenziali elettrici generati dalle diverse componenti retiniche. L'esame viene eseguito mediante l'applicazione di elettrodi corneali e cutanei che registrano il segnale elettrico proveniente dalla retina, indotto da flash luminosi di differente intensità e frequenza. Le risposte scotopiche, espressione dell'attività del sistema dei bastoncelli, sono valutate dopo un periodo di adattamento al buio di venti minuti. Le risposte fotopiche, espressione dell'attività del sistema dei coni, sono registrate dopo un periodo di adattamento alla luce di dieci minuti. La separazione delle componenti scotopiche da quelle fotopiche rende possibile eseguire una distinzione dell'ERG dei bastoncelli dall'ERG dei coni. La registrazione dell'ERG è di notevole ausilio per la diagnosi di numerose patologie retiniche, spesso su base ereditaria, come la retinite pigmentosa.

L'ERG standard misura la risposta complessiva dell'intera retina. Se un'affezione retinica interessa soltanto il centro della retina, la macula, l'ERG può risultare normale perché il centro non rappresenta che un 5% circa dell'intera retina. Per un esame specifico della macula sarà allora necessario un elettroretinogramma multifocale (mfERG). Con l'elettroretinogramma multifocale si indaga sul funzionamento della retina in modo analogo a quanto si fa mediante ERG. Attraverso la particolare forma dello stimolo

luminoso, saranno tuttavia solo i fotorecettori e le cellule bipolari della macula a reagire. Poiché i fotorecettori della macula sono in massima parte coni, l'ERG multifocale serve prioritariamente all'esame dei coni.

Con l'ERG da pattern (PERG) è possibile esaminare l'attività degli strati retinici interni e delle cellule ganglionari retiniche in risposta a stimolazione dei fotorecettori maculari. Il PERG è utile nella valutazione delle retinopatie centrali. L'input luminoso consiste in un modello di reticolo, in cui elementi bianchi e neri si alternano con frequenza regolare.

Un reticolo analogo viene utilizzato anche durante l'esame dei potenziali visivi evocati (PEV), che analizza il funzionamento delle vie visive, dall'occhio alla corteccia visiva. I PEV rappresentano la registrazione delle correnti elettriche emanate dalle cellule nervose cerebrali, in risposta ad una stimolazione visiva. Il comportamento dei PEV è essenziale nello studio delle affezioni del nervo ottico e costituisce il naturale completamento dell'ERG nell'esplorazione dell'attività retinica e nella diagnosi delle patologie della retina.

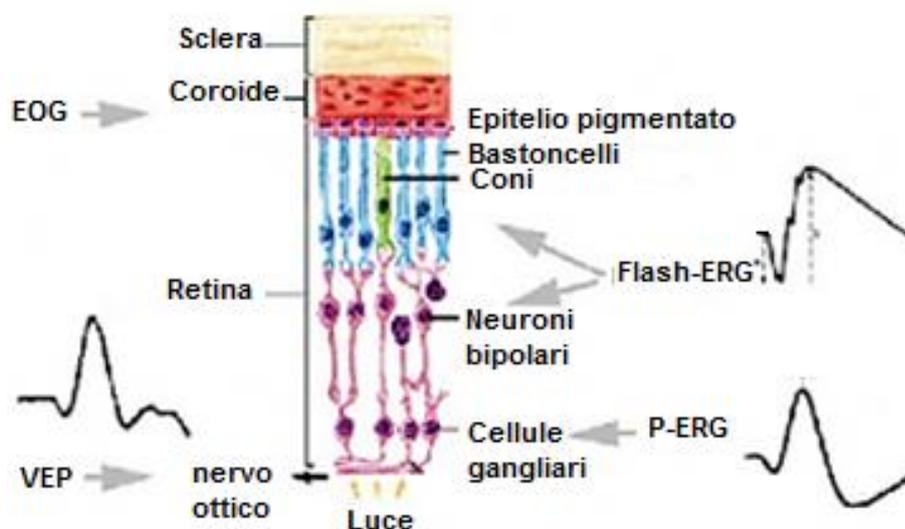


Figura 15 - Gli esami elettro-funzionali.

II.1.4 L'OCT e le tecniche angiografiche

La tomografia a coerenza ottica (OCT) è una metodica diagnostica non invasiva che fornisce immagini in sezione ad alta risoluzione dei tessuti

retinici. Si basa sul principio dell'interferometria a bassa coerenza, impiegando un fascio laser privo di radiazioni nocive, generalmente emesso da un diodo superluminescente, per analizzare gli strati e lo spessore della neuroretina mediante scansioni dettagliate e per rilevarne le eventuali alterazioni. Una tecnica di imaging affidabile e precisa, di fondamentale supporto per lo studio delle anomalie che interessano la macula e per la diagnosi e il follow-up di affezioni retiniche importanti, prima fra tutte la degenerazione maculare senile.

L'indagine di imaging della regione maculare avviene, altresì, attraverso la fluorangiografia retinica (FA) e l'angiografia con verde d'indocianina (ICGA), due tecniche angiografiche che sfruttano il principio della fluorescenza per visualizzare lo stato vascolare della retina, l'epitelio pigmentato e parte dei vasi della coroide.

La FA si attua con l'iniezione per via endovenosa di fluoresceina, una sostanza fluorescente che, tramite la circolazione sanguigna, giunge fino alla retina, rendendo visibili le arterie, i capillari e le vene. Lo stato funzionale delle pareti dei vasi sanguigni viene rilevato grazie a successivi fotogrammi del fondo oculare, effettuati in rapida sequenza.

L'angiografia con verde d'indocianina (ICGA) è un esame simile alla fluorangiografia come metodica di esecuzione, con la differenza che il colorante iniettato è in questo caso il verde di indocianina. Le caratteristiche fisico-chimiche dell'indocianina permettono una migliore visualizzazione della circolazione, permettendo di distinguere alterazioni profonde a livello di retina e coroide, non individuabili mediante la fluorangiografia.

L'esame angiografico fa uso di un retinografo corredato di un sistema ottico, in grado di mettere a fuoco il fondo oculare, e di una sorgente luminosa che emette luce monocromatica con lunghezza d'onda di 490 nm per l'angiografia con fluoresceina, oppure di 800-810 nm per l'angiografia con verde d'indocianina. Lunghezza d'onda, quest'ultima, corrispondente all'infrarosso, il quale è in grado di oltrepassare la barriera naturale offerta dalle strutture retiniche per arrivare sino alla rete vascolare della coroide [5], [6], [7], [12], [18].

II.2 RETINOPATIE ASSOCIATE ALLA DEGENERAZIONE DEI FOTORECETTORI

La maggior causa di disabilità visiva incurabile è la perdita della vitalità funzionale delle cellule fotosensibili della retina. Le retinopatie degenerative si caratterizzano per la progressiva morte dei fotorecettori che “catturano le immagini”, mentre i neuroni retinici interni che “processano le immagini” restano in gran parte integri.

Il decorso del processo di degenerazione dei fotorecettori è differenziato. Può coinvolgere la zona di maggiore acuità visiva o può interessare man mano l'intera area retinica. La malattia più frequente della regione centrale della retina è la degenerazione maculare legata all'età. Rare forme ereditarie di degenerazione maculare si manifestano anche in età giovanile, quali le malattie di Stargardt e di Best. Il soggetto colpito va incontro a menomazione visiva grave, ad andamento progressivo, che può condurre alla perdita completa ed irreversibile della visione centrale.

Diverso è invece il decorso delle degenerazioni retiniche ereditarie che interessano l'intera retina. Le forme più comuni sono la retinite pigmentosa e la sindrome di Usher. I primi sintomi sono generalmente cecità notturna e limitazioni del campo visivo. Nella sindrome di Usher, la RP si accompagna a sordità congenita o a debolezza d'udito. Il degrado del campo visivo comincia alla periferia e genera la cosiddetta “vista a tunnel”. Esistono anche forme di RP in cui il deterioramento del campo visivo inizia al centro (RP inversa). Spesso queste patologie vengono diagnosticate già nell'infanzia o all'inizio dell'età adulta ma possono essere riconosciute anche più tardi. Il decorso è lento.

Ciò che accomuna tali retinopatie degenerative è il fatto di essere trattabili soltanto in casi particolari o di non esserlo del tutto.

II.2.1 La degenerazione maculare legata all'età

La degenerazione maculare legata all'età (Age-related macular degeneration o AMD) è una patologia oculare che coinvolge la macula, sede della visione

distinta. Il fenomeno correlato alla degenerazione maculare senile è il processo d'invecchiamento dell'occhio, che determina il deterioramento dei fotorecettori della macula, i coni. Nei paesi industrializzati, l'AMD rappresenta attualmente la principale causa di grave riduzione della visione centrale in soggetti di età superiore ai 65 anni e insorge nella popolazione con frequenza proporzionale all'aumento dell'età. Indicativamente il 5% della cecità mondiale è dovuto all'AMD, una percentuale che sfiora il 41% nei paesi benestanti. Si prevede che nel 2020 circa 196 milioni di persone saranno colpite da degenerazione maculare senile, cifra probabilmente destinata a crescere con quanto più aumenterà l'invecchiamento demografico mondiale.

L'individuo affetto da AMD è soggetto alla progressiva perdita della visione centrale e distinta. Le immagini appaiono dapprima sfocate e confuse, si riscontrano riduzione della sensibilità al contrasto e ai colori, percezione distorta della sensazione visiva, incapacità di visione dei piccoli dettagli. La metamorfopsia, cioè la deformazione delle immagini che costituisce il segnale più tipico e precoce della malattia, è facilmente individuabile mediante il test del reticolo di Amsler: il paziente vede deformate o spezzate le righe dritte.

La progressione della malattia comporta la comparsa di uno scotoma centrale, ossia l'instaurarsi di una macchia scura al centro del campo visivo, espressione del danneggiamento dell'acuità visiva centrale, con permanenza della visione periferica, utile nella deambulazione e nell'orientamento.

La malattia è stata individuata alla fine dell'800, ma soltanto negli ultimi decenni il miglioramento delle tecniche diagnostiche - soprattutto con l'utilizzo della fluorangiografia - ha permesso di identificare precocemente i quadri clinici. Gli sforzi attuali dell'oftalmologia si pongono l'obiettivo di riconoscere tempestivamente le lesioni retiniche iniziali, le drusen (o corpi colloidali), i caratteristici depositi sottoretinici che compaiono nell'epitelio pigmentato, risultato di una incompleta digestione dei dischi del segmento esterno dei fotorecettori da parte dell'epitelio pigmentato e sintomo clinico precoce dell'AMD. L'evoluzione dell'AMD può incorrere in forme

atrofiche, con lenta diminuzione della vista, oppure in forme edematose, con comparsa di vasi neoformati.

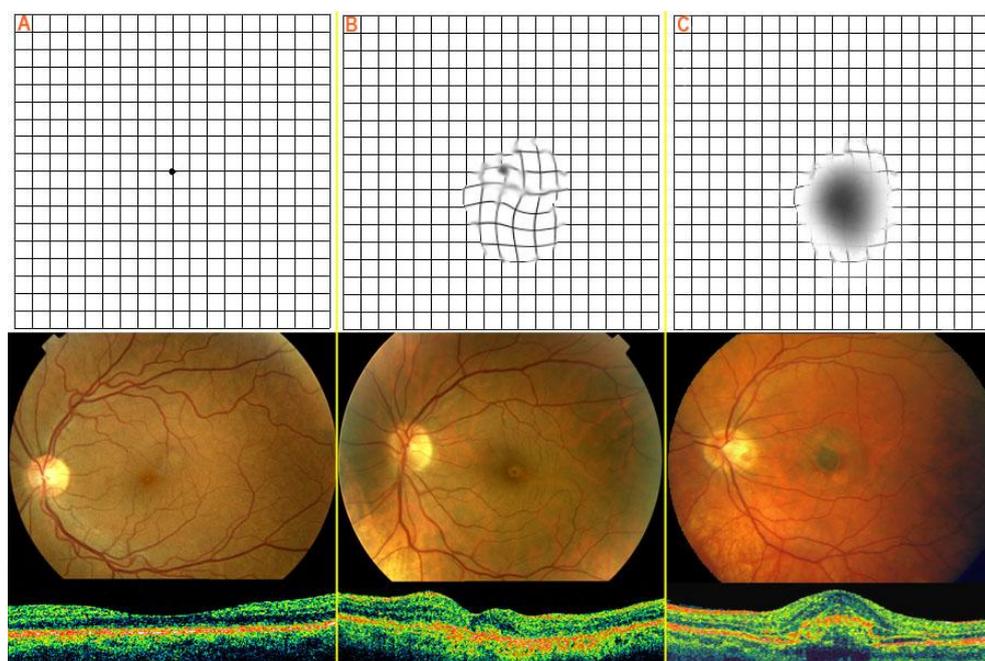


Figura 16 - Visualizzazione dell'evoluzione dell'AMD, mediante test di Amsler, esame del fondo oculare e OCT. A) Visione normale; B) metamorfopsia iniziale: percezione di righe distorte; C) comparsa dello scotoma centrale.

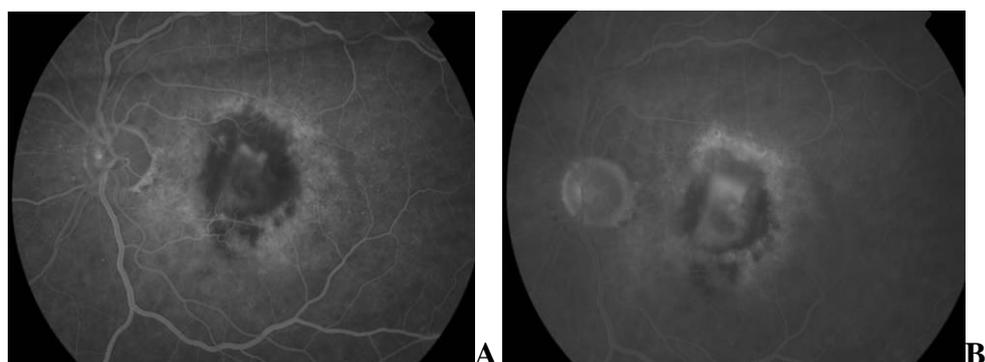


Figura 17 - Fluorangiografia: A) tempi precoci; B) tempi tardivi.

La degenerazione maculare atrofica (o asciutta) è la forma più comune e solo nel 15% dei casi si rende responsabile di gravi riduzioni dell'acuità visiva. È il risultato di una graduale perdita di cellule dell'epitelio pigmentato con conseguente morte dei fotorecettori e occlusione della coriocalpillare, la rete vascolare della coroide che fornisce nutrimento e

ossigeno all'epitelio pigmentato e agli strati retinici esterni. Nelle fasi iniziali l'esame oftalmoscopico evidenzia degli accumuli focali di pigmento contigui a piccole aree di atrofia che successivamente tendono ad espandersi interessando gran parte della regione maculare con tardivo coinvolgimento della foveola, zona della fovea caratterizzata da una concentrazione ancora più fitta di fotorecettori. La perdita della vista è graduale e dipende dall'estensione delle lesioni a livello maculare.

Meno frequente ma più grave e più rapida è la forma essudativa (o umida) della degenerazione maculare senile, causa del 90% dei casi di cecità legale. Si manifesta con la proliferazione di neovasi che originano dalla coroide e si sviluppano al di sotto degli strati retinici. La membrana neovascolare sottoretinica cresce provocando fenomeni essudativi ed emorragici di varia entità. Quando la membrana è localizzata in sede extrafoveale il paziente è solitamente asintomatico ma con il coinvolgimento della fovea il soggetto lamenterà riduzione del visus accompagnata a metamorfopsie. Le membrane neovascolari tendono a formare una grossa cicatrice al centro della retina, con conseguente distruzione dei fotorecettori e diminuzione della vista centrale. La formazione degli anomali neovasi provoca il sollevamento degli strati retinici rendendo inefficace la percezione e la trasmissione del segnale visivo.

La degenerazione maculare senile è una malattia multifattoriale, correlata alla predisposizione genetica, all'invecchiamento, all'esposizione ad ambienti sfavorevoli e allo stile di vita. Questi fattori, oltre a svolgere un danno diretto sull'organismo, modificano la disponibilità e la necessità di elementi nutrizionali con funzione strutturale e protettiva. Alcuni studi hanno rilevato l'importanza del ruolo dei radicali liberi nell'evoluzione della degenerazione maculare senile. L'esposizione all'ambiente esterno, alla luce e a fattori tossici, i processi fisiologici come il metabolismo e l'invecchiamento, innescano numerose reazioni a livello della retina, responsabili della sintesi di radicali liberi. La capacità di questi composti di indurre un danno ossidativo a livello delle membrane e dei sistemi enzimatici retinici costituisce un aspetto critico nella patogenesi dell'AMD.

Per la formazione di radicali liberi occorrono due principali elementi: una fonte di energia e l'ossigeno. Per quanto riguarda l'occhio, la via più comune di danno ossidativo è quella fotochimica. L'energia luminosa può venir assorbita da molecole sensibili che reagiscono con particolari substrati o con ossigeno molecolare. La luce, soprattutto quella ultravioletta, che raggiunge la macula è in grado di danneggiare sia l'epitelio pigmentato che i fotorecettori, specialmente i coni che rispondono alla luce blu. La protezione nei confronti dei radicali liberi, essenziale per i sistemi cellulari, è assicurata dall'interazione di sistemi di origine endogena con fattori esogeni di tipo nutrizionale, ad azione antiossidante, che agiscono come cofattori enzimatici o come antiossidanti (vitamine, carotenoidi).

Diversi trattamenti hanno mostrata una certa efficacia nel rallentare la progressione della patologia, ma nessuna cura esiste [5], [7], [11], [13], [15].

II.2.2 La retinite pigmentosa

Retinite pigmentosa (RP) è la denominazione applicata ad un insieme di malattie ereditarie della retina correlate alla perdita dei fotorecettori, che provocano la riduzione progressiva della visione notturna e del campo visivo periferico. L'incidenza globale della RP è di 1 ogni 3500/4000 nascite e compare molto spesso fra la pubertà e l'età matura, portando sovente alla cecità nell'età avanzata.

Il processo patologico inizia con alterazioni dell'epitelio pigmentato retinico; col progredire della RP, si verifica un assottigliamento dei vasi sanguigni che irrorano la retina, i quali vanno incontro ad atrofia. Variazioni atrofiche e danni possono coinvolgere anche il nervo ottico e, gradualmente, le cellule fotosensibili della retina muiono. I pazienti colpiti da retinite pigmentosa manifestano inizialmente emeralopia, cioè difficoltà visive in condizioni di scarsa illuminazione, problemi di adattamento nel passaggio da ambienti illuminati ad ambienti oscuri ed elevata sensibilità all'abbagliamento: fenomeni dovuti al fatto che, nelle prime fasi dello sviluppo, la malattia aggredisce prevalentemente i bastoncelli.

La funzionalità dei fotorecettori si indebolisce dapprima nella regione periferica media, con costrizione del campo visivo, seguita da una completa soppressione della visione periferica, con caratteristica comparsa di scotoma ad anello e tipica visione tubulare. La visione centrale è risparmiata fino alle fasi successive della malattia, in cui la distrofia può estendersi ai coni della macula, con perdita del visus e incapacità di distinguere i colori. Il decorso della patologia ha durata variabile ma è pur sempre progressivo ed invalidante. In molti casi, l'esito finale consiste in una condizione di visione limitata per tutta la vita, nei casi peggiori la RP si aggrava arrecando cecità assoluta.

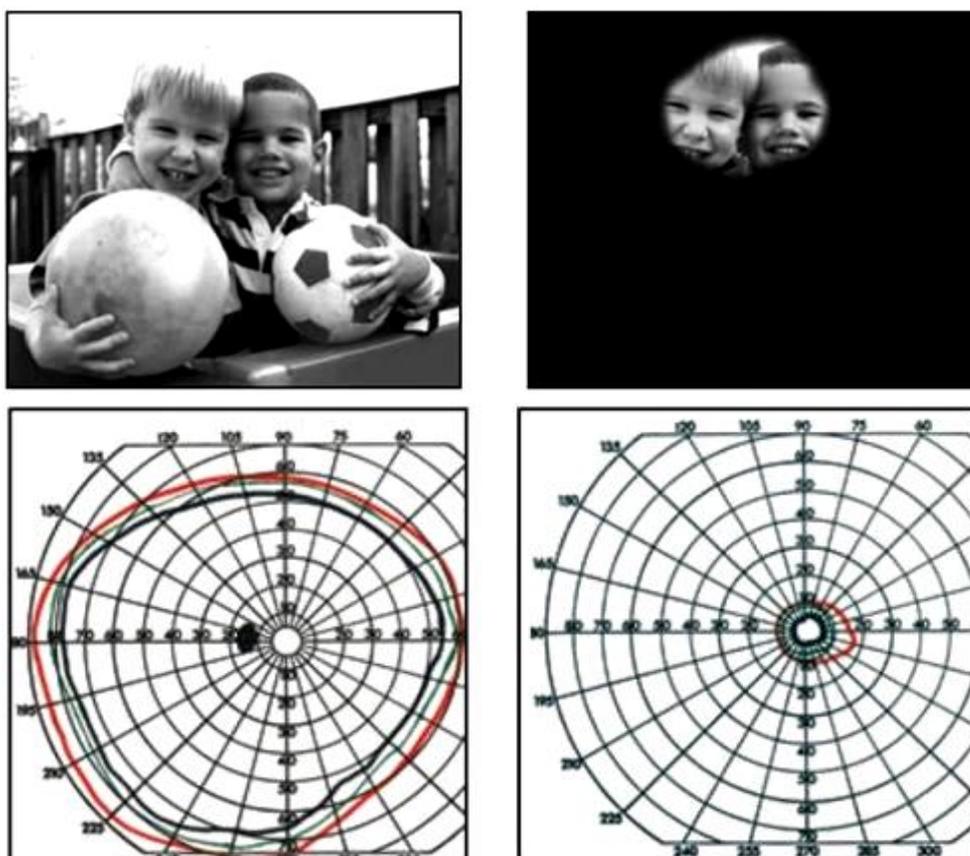


Figura 18 - Visione normale (a sinistra) e visione “a tunnel” in soggetto affetto da RP (a destra); corrispondente circoscrizione del campo visivo.

Recenti studi di genetica molecolare sulla RP hanno dimostrato che esiste un meccanismo patogenetico, la degenerazione primitiva dei fotorecettori, che avviene sulla base di mutazioni di geni che codificano per importanti

proteine implicate nel ciclo della visione. Ad oggi, grazie alle nuove tecniche di sequenziamento del DNA, sono stati identificati più di 50 difetti genetici differenti coinvolti nella retinite pigmentosa. Le alterazioni più frequenti riguardano il gene della rodopsina (il fotopigmento dei bastoncelli retinici), localizzato sul cromosoma 3. Un ulteriore gene che risulta mutato in alcuni casi di RP è quello della periferina (proteina strutturale specifica che partecipa alla formazione e alla stabilizzazione della struttura fine dei fotorecettori), situato sul cromosoma 6. Altre forme sono state associate ad alterazioni presenti nel cromosoma X.

La via di trasmissione delle anomalie genetiche retiniche dai genitori ai figli segue uno dei tre modelli di ereditarietà : autosomica recessiva, autosomica dominante o X-linked.

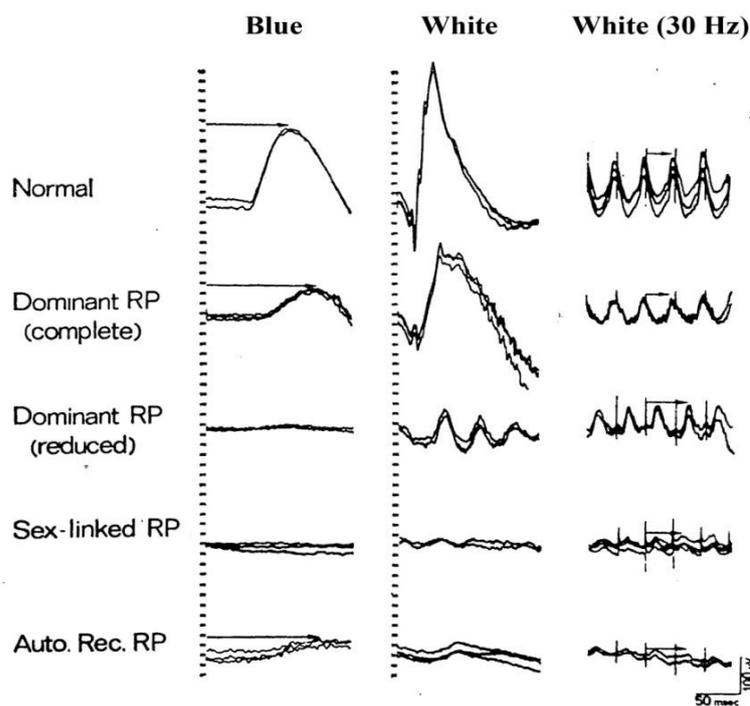


Figura 19 - Attività dei fotorecettori retinici visualizzata mediante ERG, in condizioni normali e nelle forme autosomica dominante, X-linked e autosomica recessiva di retinite pigmentosa.

L'esame diagnostico chiave per l'analisi e il monitoraggio dell'attività elettro-fisiologica della retina in RP è l'elettroretinogramma, che appare

subnormale, appiattito o completamente estinto, anche quando il quadro oftalmoscopico non presenta ancora i segni tipici della malattia.

Buona parte dei casi di RP (circa il 30%) è a trasmissione autosomica recessiva. La forma autosomica dominante si presenta in circa il 15% dei casi, mentre quella legata al cromosoma X in circa il 5% dei casi. La RP autosomica dominante è trasmessa dai genitori ai figli, è presente in ogni generazione e può colpire maschi e femmine con pari frequenza. La forma autosomica recessiva invece salta le generazioni, non è infrequente l'evenienza che in una famiglia compaia a memoria d'uomo un solo caso, ovvero che sia simulata una forma sporadica. Secondo la trasmissione legata al cromosoma X, cioè legata al sesso, risultano colpiti dalla malattia solo soggetti di sesso maschile, i quali ereditano il gene patologico dalla madre che è portatrice sana; data una donna in tale condizione, il rischio di contrarre la RP per ogni figlio maschio è del 50%.

La genetica molecolare si propone di comprendere e indagare a fondo i meccanismi molecolari che innescano l'apoptosi dei fotorecettori della retina e le mutazioni genetiche che attivano le stesse vie di morte cellulare, processi alla base delle distrofie retiniche ereditarie come la RP.

Al momento non esiste cura che arresti lo sviluppo della malattia, ma la ricerca internazionale sulle terapie geniche e sulla visione artificiale promette possibili soluzioni [5], [7], [8], [9], [10]

III. SISTEMI ARTIFICIALI IMPIANTABILI PER IL RECUPERO DELLA FUNZIONALITÀ VISIVA

Sistemi artificiali che possono sostenere o sostituire la funzione di organi biologici compromessi trovano applicazione nelle protesi visive impiantabili, dispositivi in grado di recuperare parzialmente il senso della vista mediante la trasmissione di stimoli elettrici al sistema nervoso. I recenti sviluppi tecnologici offrono ai soggetti affetti da grave disabilità visiva la possibilità di rinvenire una risposta sensoriale artificiale agli stimoli luminosi esterni, ripristinando almeno in parte la capacità di distinguere luci, ombre, contorni e migliorando la qualità di vita dei pazienti stessi.

Lo studio e la comprensione delle caratteristiche della visione umana e la possibilità di stimolare zone del percorso visivo hanno incoraggiato la progettazione dell'“occhio artificiale”, cioè un impianto neuroprotesico biomimetico che replichi la naturale funzione di percezione ed elaborazione dello stimolo visivo, sulla base degli stessi principi computazionali a cui obbedisce il sistema nervoso, laddove le strutture biologiche preposte al medesimo compito risultino danneggiate o alterate.

L'obiettivo, nel lungo termine, degli studi sulla visione artificiale, è il ripristino di una visione completa; nel breve termine, il traguardo consiste nell'ottenere una risoluzione spazio-temporale che consenta al paziente di recuperare maggiore autosufficienza motoria e consapevolezza dell'ambiente circostante.

La realizzazione di una protesi visiva impiantabile è vincolata da fondamentali requisiti. Uno dei primi aspetti da valutare riguarda l'interazione fra il dispositivo e l'ambiente biologico dell'organismo ospite: la biocompatibilità. L'accettazione dell'impianto da parte dell'organismo avviene sulla base del riconoscimento della natura dei materiali impiegati; è

necessario che questi siano atossici e bistabili e sia garantita la tolleranza del corpo estraneo da parte dei tessuti naturali, così da evitare risposte indesiderate o alterazioni dannose. La geometria dell'impianto dovrà inoltre adattarsi alla forma anatomica del punto in cui esso viene inserito, in modo da assicurare la compatibilità morfologica fra il tessuto sostitutivo e l'ambiente circostante. È richiesto che il dispositivo sia meccanicamente resistente e, vista la delicatezza dei siti in cui alloggerà, leggerezza ed elevata flessibilità d'impianto sono di necessaria importanza. Il funzionamento a lungo termine, i ridotti consumi energetici e la capacità di adattarsi a diversi livelli di luminosità migliorano l'efficienza della protesi. Un rischio per questo genere di dispositivi è dato dalla formazione di tessuto fibroso attorno all'impianto, che potrebbe causare nel tempo un incremento della resistenza all'interfaccia elettrodo-tessuto. Pertanto un sistema di controllo retroazionato consentirà al dispositivo di modulare l'intensità dello stimolo in funzione delle variazioni dell'ambiente esterno. I componenti microelettronici richiedono locazioni che garantiscano un sufficiente isolamento elettrico e una protezione contro l'umidità. Il trasferimento di energia deve essere assicurato tramite sistemi telemetrici o batterie impiantabili e minimizzato per evitare un eccessivo riscaldamento, pericoloso per la protesi.

L'affidabilità e la compatibilità di un dispositivo medico sono caratteristiche rilevanti nella progettazione di un sistema artificiale che viene impiantato permanentemente in posizione intracorporea. A causa della dinamicità dei fenomeni di interazione tra il dispositivo e l'organismo, affidabilità e compatibilità variano, solitamente peggiorando, nel tempo. Data la probabilità percentuale $I_i(t)$ che si verifichi l'insuccesso della protesi, per la causa i -esima, l'affidabilità percentuale i -esima sarà:

$$A_i(t) = 100 - I_i(t)$$

L'affidabilità globale è pari al prodotto delle singole affidabilità $A_g = A_1 \times A_2 \times A_3 \times \dots \times A_n$ [36].

In qualità di impianto sostitutivo adibito all'emulazione di una funzione sensoriale del sistema nervoso, la visione, la protesi visiva rappresenta un

modello di neuroprotesi sensoriale. Utilizzando segnali generati artificialmente per stimolare il tessuto nervoso, le neuroprotesi visive appartengono alla classe delle interfacce neurali BMI (brain-machine interfaces) di tipo 1. L'impianto dedicato alla riproduzione di una funzione sensoriale dispone di un codice neurale per l'interpretazione delle informazioni artificiali e la codifica in impulsi elettrici comprensibili dal sistema nervoso, con l'obiettivo di migliorare la facilità di apprendimento dei segnali percepiti e massimizzare la velocità di trasferimento dei dati sensoriali al cervello [3].

La struttura tipica di una protesi visiva impiantabile è organizzata in due unità distinte.

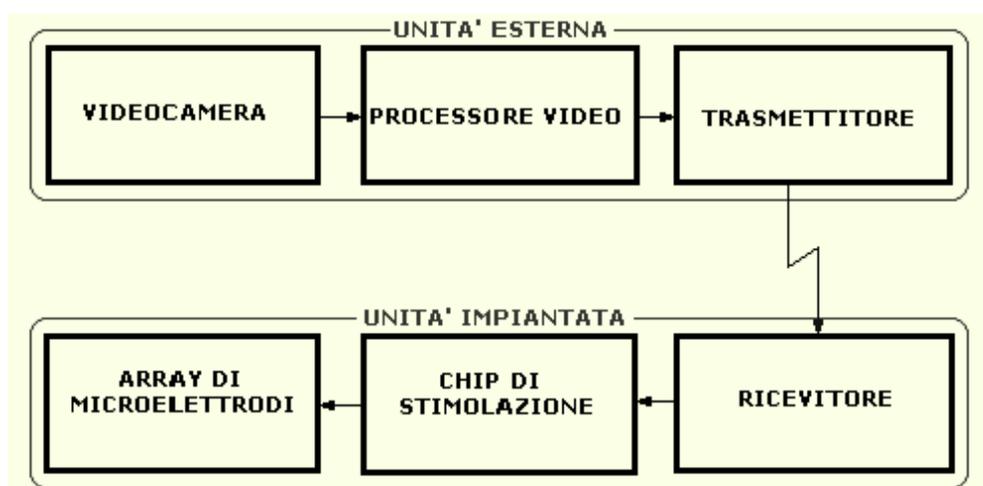


Figura 20 - Struttura tipica di una protesi visiva impiantabile.

L'unità esterna è provvista di una videocamera, che acquisisce l'immagine grazie ad una telecamera (in genere di tipo CMOS o CCD per via del ridotto consumo e della buona duttilità) e ad un processore video, che ha la funzione di elaborare l'immagine eliminando le informazioni superflue ed amplificando quelle utili. Il segnale in uscita dalla telecamera deve essere pre-filtrato, per ridurre il problema dell'aliasing, e digitalizzato. Le fasi del processo di elaborazione del segnale svolto dal video processore sono: la convoluzione, cioè una simulazione dell'operazione di integrazione spaziale e temporale dell'informazione visiva che avviene nei diversi strati della

retina, l'aumento del contrasto e il riconoscimento dei contorni, o edge detection, con lo scopo di intensificare i punti dell'immagine in modo da renderla più semplice e più facile da rappresentare, la riduzione dei dati e del rumore, realizzata effettuando la trasformata di Fourier del segnale ed eliminando le frequenze contenenti informazioni inutili. L'aumento del rapporto segnale/rumore serve per ridurre il rumore, concentrato soprattutto alle alte frequenze, e per minimizzare il più possibile la distorsione dell'immagine. Il trasmettitore è il componente dell'unità esterna che si occupa di trasmettere il segnale e di trasferire potenza necessaria per l'alimentazione del dispositivo impiantato. La trasmissione avviene grazie a sistemi a radio frequenza, comunicazione ottica con fascio laser o per mezzo di cavo conduttore. Al ricevitore, presente nell'unità impiantata intraoculare, giunge l'informazione decodificata dal trasmettitore. Il chip di stimolazione interno genera gli impulsi elettrici da trasferire agli elettrodi: gli impulsi devono avere ampiezza, frequenza e durata tali da suscitare una sensazione visiva nel paziente ma tali da non danneggiare, a causa del riscaldamento per effetto Joule, i tessuti circostanti. Al fine di evitare la dissoluzione dell'elettrodo per via di correnti ioniche si preferisce impiegare impulsi bifasici, simmetrici e compensati. Gli effetti galvanici vengono eliminati con la successione di due onde rettangolari uguali e di segno opposto, in modo che la media elettrica sia nulla.

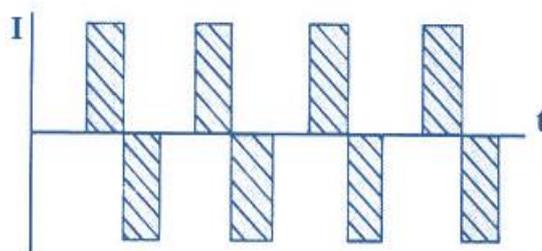


Figura 21 - Treno di impulsi bifasici, simmetrici e compensati.

La microstimolazione elettrica del tessuto nervoso avviene attraverso array di microelettrodi, interfacce di connessione fra i neuroni e i circuiti

elettronici; è necessario che essi siano biocompatibili a lungo termine e di forma tale da non provocare eccessivo stress meccanico al sito d'impianto.

Tutte le protesi visive condividono un comune set di componenti di sistema; la differenza significativa risiede nella locazione dell'interfaccia verso il sistema nervoso.

Stimolando alcune parti del sistema nervoso dedicate alla vista si ha da parte del paziente la percezione di spot luminosi, detti fosfeni, di intensità direttamente dipendente dall'intensità della corrente elettrica introdotta dall'esterno. È possibile evocare una sensazione visiva mediante la stimolazione elettrica di un punto qualsiasi della circuiteria neurale di elaborazione dell'informazione visiva, dalla retina al nervo ottico e alla corteccia visiva. Il sito di applicazione dell'impianto dipenderà dalla patologia e dalla regione del percorso visivo compromessa, che si intende riattivare mediante elettrostimolazione.

L'informazione visiva subisce la prima trasformazione a livello della retina; più profondamente nel cammino nervoso sarà applicata la protesi, maggiore sarà l'elaborazione a cui verrà sottoposto il segnale in uscita dalla telecamera, prima di raggiungere gli elettrodi [37].

III.1 PROTESI RETINALI

Distrofie retiniche che colpiscono la retina esterna sono potenzialmente trattabili con protesi retinali. Le due più comuni patologie della retina esterna sono la degenerazione maculare legata all'età e la retinite pigmentosa, la prima delle quali è maggiormente diffusa ma la seconda è più severa. La terapia fotodinamica o la convenzionale laser terapia per l'AMD e la farmacoterapia o la terapia genica per la RP sono alcuni esempi di approccio medico per rallentare la progressione della cecità causata dalle forme acquisite o ereditarie di degenerazione retinica. L'impianto di protesi retinica costituisce un valido espediente per ristabilire un parziale senso

della visione. Esso richiede tuttavia la presenza di cellule vitali nella retina interna.

La valutazione post-mortem dello stato funzionale di una retina con RP o AMD ha mostrato un largo numero di cellule rimaste intatte nella porzione interna, rispetto alla degenerazione dei fotorecettori che occupano la retina esterna. Nelle forme gravi di RP, solo il 4% delle cellule fotosensoriali della macula sopravvive, ma l'80% della retina interna e il 30% delle cellule gangliari restano illesi. Nelle regioni extramaculari il 40% della retina interna rimane attivo. In AMD, il 90% delle cellule della retina interna conserva la propria funzionalità. Sia in RP sia in AMD, gli strati retinici interni appaiono affetti in misura minore dalla malattia, rispetto ai fotorecettori. La retinite pigmentosa e la degenerazione maculare senile non comportano quindi una completa degenerazione della retina; la stimolazione elettrica della retina umana dimostra che esistono strati nervosi interni ancora responsivi, in grado di generare sensazioni visive. La protesi retinica sfrutta la funzionalità residua del tessuto nervoso naturale, aggirando i danni subiti dalle cellule fotorecettoriali, per trasmettere gli impulsi elettrici artificiali al centro di elaborazione cerebrale, attraverso il nervo ottico. Il dispositivo deve essere in grado di operare alcune funzioni di base: rilevare la luce emanata da sorgenti esterne, trasdurre i segnali luminosi in stimoli elettrici, consegnare alla retina l'informazione artificiale al fine di evocare una risposta. Inoltre deve essere sicura ed efficace, accettata dal paziente e funzionale nel corpo umano per decenni.

Per assolvere questi compiti, essa si avvale di un sistema di image processing e di tecniche di trasmissione telemetrica che controllano l'elaborazione e il trasferimento del segnale visivo al chip microelettronico. Il componente microelettronico si interfaccia alla retina mediante array di microelettrodi e/o array di microfotodiodi, che sono impiantati direttamente all'interno dell'occhio e vanno a stimolare le cellule nervose che preservano ancora vitalità, fra cui cellule gangliari, cellule amacrine, cellule orizzontali, cellule bipolari e, in qualche caso, alcuni fotorecettori. Il segnale elettrico, viaggiando lungo gli assoni delle cellule gangliari e i centri di controllo

della visione, raggiungerà l'area visiva corticale inducendo la formazione di fosfeni.

Il sistema di image processing converte l'immagine acquisita dalla telecamera in segnali di stimolo, includendo anche operazioni di zoom, aggiustamento della lucentezza e intensificazione dei contrasti. Sono necessarie operazioni in real-time, poiché il soggetto deve mettere in correlazione la direzione della telecamera con la locazione della percezione e gli stimoli devono essere trasmessi abbastanza velocemente da poter creare la percezione della zona in cui la telecamera è puntata. I principali algoritmi di image processing includono il processo di decimazione e alcuni processi di miglioramento.

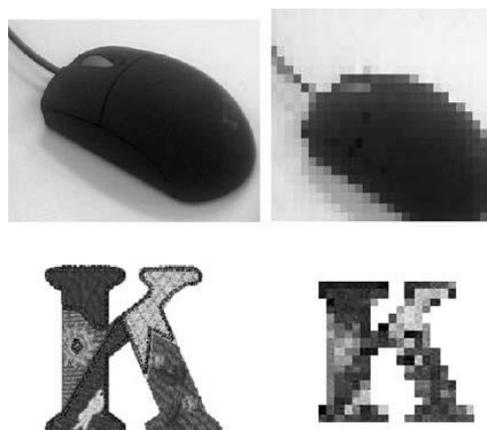


Figura 22 - Decimazione dell'immagine: la forma complessiva dell'oggetto è facilmente interpretabile anche dopo la decimazione (in alto), i dettagli fini vengono persi (in basso).

La decimazione è un sottocampionamento che elimina la ridondanza nella rappresentazione del segnale, importante perché la risoluzione delle telecamere disponibili attualmente in commercio è più elevata rispetto al numero di elettrodi che compongono la protesi retinica e dalla cui densità dipende la definizione dell'immagine.

La potenza elettrica e le informazioni necessitano di essere trasmesse all'impianto interno dall'unità esterna per alimentare tutta la componente elettronica adibita alla stimolazione della retina e, dato che la protesi retinica lavora in real-time, essa necessita di un'alimentazione continua. La

comunicazione di dati istantanea e bidirezionale tra l'esterno e l'unità impiantata è essenziale per due distinte ragioni: trasferire parametri di stimolo all'impianto e trasferire informazioni diagnostiche dall'impianto. Mentre la connessione con i parametri di stimolo, mediante telemetria diretta, ha la funzione di indurre la stimolazione, il collegamento diagnostico, mediante telemetria inversa, può monitorare l'unità impiantata per verificarne il corretto funzionamento, la sicurezza e l'ottimizzazione delle performance di tutto il sistema, fornendo un segnale di feedback per la manipolazione dei parametri. L'accoppiamento induttivo per il trasferimento di energia elettrica è stato il primo metodo efficace nel trasmettere una potenza significativa ma, poiché la forza del campo magnetico indotto dall'avvolgimento decresce in modo proporzionale alla distanza, questo genere di connessione è adatta solo per distanze molto piccole tra trasmettitore e ricevitore. L'impiego di materiale magnetico deve essere valutato con attenzione in quanto potrebbe causare effetti avversi nell'individuo se questo viene a contatto con un campo magnetico esterno non correlato.

L'intero sistema è alimentato da una batteria esterna portatile, con un trasmettitore di potenza che viene trasferita all'impianto per induzione elettromagnetica, mediante l'accoppiamento degli avvolgimenti L_1 e L_2 . L'amplificatore di potenza dell'unità primaria converte il segnale di corrente continua in un impulso a radio-frequenza e lo invia all'avvolgimento secondario L_2 , attraverso il campo magnetico. Il segnale indotto viene riconvertito in un nuovo segnale a corrente continua da fornire alla componente elettronica interna grazie a un circuito di recupero d'energia.

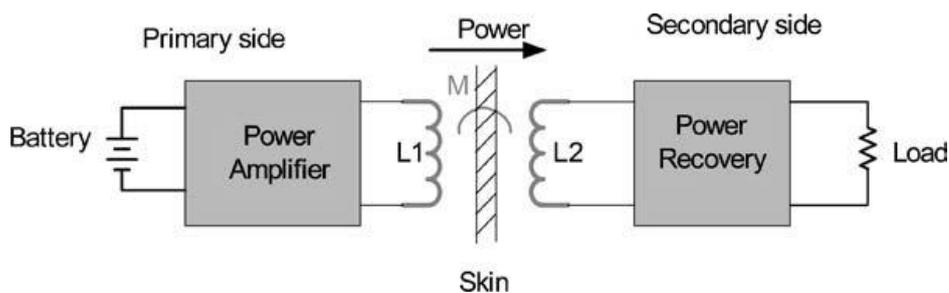


Figura 23 - Diagramma dei componenti telemetrici di potenza.

I segnali di dati e di clock, nell'unità esterna, sono codificati, modulati e trasmessi all'impianto interno dall'avvolgimento primario.

L'avvolgimento secondario riceve il flusso di dati che, dopo essere stati filtrati, amplificati e demodulati, vengono successivamente inviati al chip stimolatore.

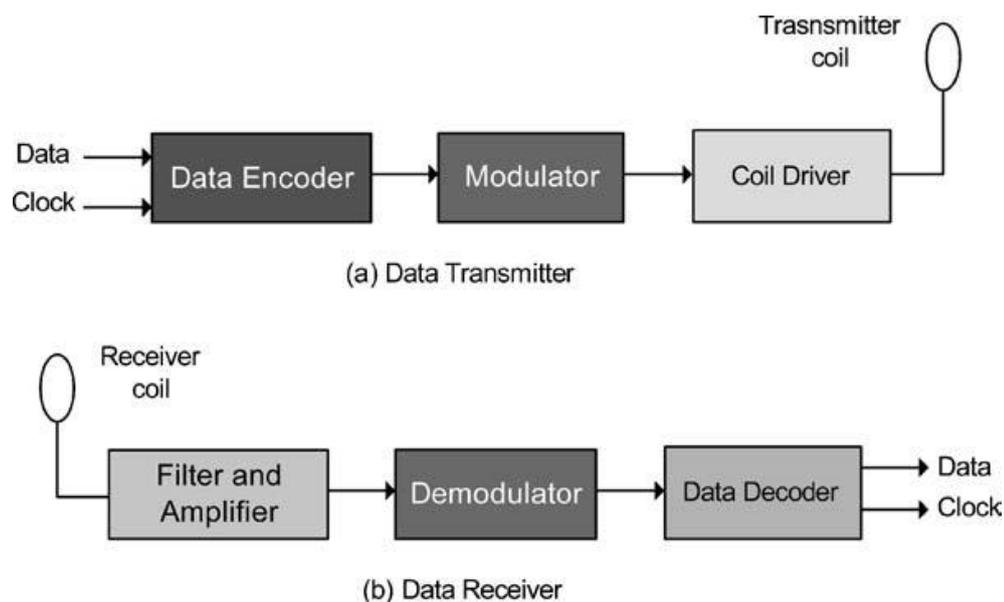


Figura 24 - Diagramma dei componenti di trasmissione (a) e ricezione (b) telemetrica dei dati.

L'impianto di trasmettitori in sistemi biologici provoca il deposito di energia elettromagnetica e termica nel corpo, nelle vicinanze del dispositivo. Un impianto wireless di trasmissione di dati e potenza emette forze dovute al campo elettromagnetico che vengono indirettamente trasformate in calore, mentre il ricevitore dissipa direttamente il calore nel tessuto biologico. L'indice di attenuazione di radiazioni RF nel tessuto varia in base allo spettro di frequenza; l'Institute of Electrical and Electronics Engineer (IEEE) ha definito un livello di sicurezza standard di esposizione umana a campi magnetici a radio frequenza compreso fra 3 Khz e 3 Ghz, che ogni impianto deve rispettare.

Il cuore della protesi retinica è il chip microelettronico, che fornisce gli stimoli alla retina. Tecnologie VLSI (Very large-scale integration) sono utilizzate al fine di realizzare chip specializzati per la stimolazione retinica. Nella progettazione di un buon chip stimolatore, vengono considerati tre

requisiti necessari: dimensioni, consumo di potenza e capacità di uscita. Quest'ultima è la più importante dei tre: il chip deve essere in grado di generare un adeguato segnale di uscita attraverso l'elettrodo, per evocare la percezione di fosfeni.

Standard europei stabiliscono che il funzionamento dell'impianto non deve superare di un grado centigrado la temperatura corporea di 37 gradi, pertanto è fondamentale che lo stimolo di corrente e l'impedenza dell'elettrodo siano tali da fornire un'adeguata potenza al chip, dissipata poi sotto forma di calore dallo stesso. I limiti fisici del chip intraoculare sono stimati a 5x5 mm per un chip rigido, poiché un'incisione di dimensioni superiori ai 5 mm nella sclera è difficile da trattare chirurgicamente.

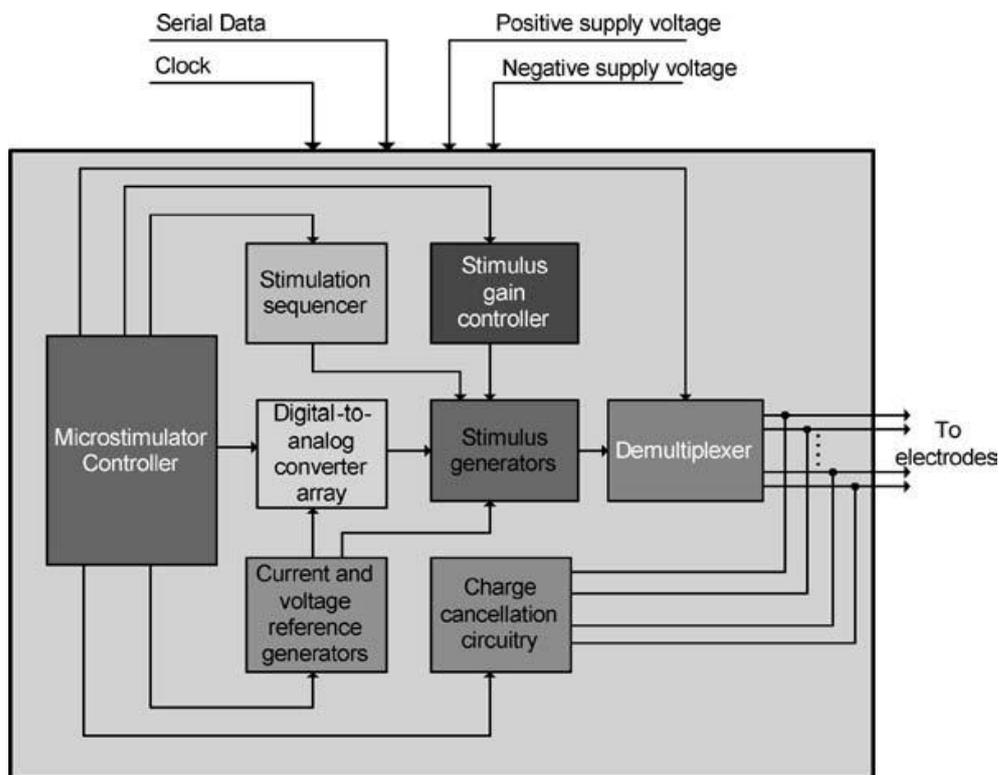


Figura 25 - Architettura di un circuito microstimolatore.

Il microstimolatore retinico emula il processo di stimolazione naturale della retina, ricevendo in ingresso dati e segnali di clock provenienti dal sistema telemetrico. Il controllore principale sequenzializza l'output da inviare al generatore di stimoli, imposta il guadagno, controlla la conversione digitale-

analogica (DAC) e imposta corrente e voltaggio di riferimento. Il DAC a sua volta coordina l'amplificazione dell'impulso di corrente indirizzato al generatore di stimoli, mentre l'ampiezza di ogni impulso è gestita dallo stimolatore sequenziale, in accordo con i dati in ingresso. Il generatore di impulsi invia il segnale di corrente ad un demultiplexer, che seleziona le singole informazioni in ingresso inviandole agli elettrodi.

È presente inoltre un circuito di cancellazione della carica che assicura che non vi siano eventuali accumuli di carica sugli elettrodi.

L'implementazione di un'interfaccia elettrodo-retina stabile deve soddisfare requisiti fondamentali e presenta numerose difficoltà. Molte di queste sfide derivano dal fatto che la retina è sferica e la tecnologia per microelettrodi produce tipicamente strutture planari. La curvatura dell'occhio non è costante e una discrepanza di soli 200 μm può risultare significativa. Se il disadattamento del dispositivo alla curvatura oculare provoca pressione sulla retina, essa può subire un danneggiamento. Inoltre se il disaccoppiamento determina la separazione degli elettrodi dalla retina, occorre maggior corrente per attivare la retina. L'elettrodo di stimolazione retinica ideale dovrebbe avere la giusta flessibilità per accompagnare la curvatura della retina senza causare sollecitazioni meccaniche importanti. I componenti di un elettrodo sono: il substrato, che agisce da carrier/supporto meccanico e isolante elettrico, il conduttore, che connette il chip di stimolazione al sito dell'elettrodo, e l'interfaccia che trasmette il segnale al nervo ottico.

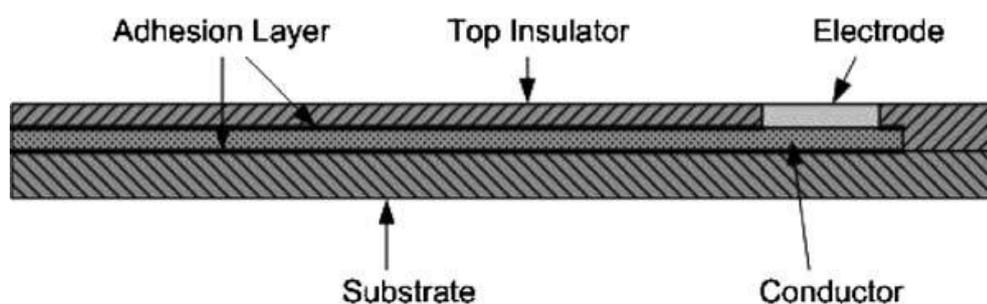


Figura 26 - Struttura di un elettrodo.

Il conduttore può essere composto dal medesimo materiale dell'elettrodo o da materiale differente. I conduttori metallici presentano la più alta conduttività, ma i semiconduttori sono talvolta più compatibili con il processo di fabbricazione dell'elettrodo. Il materiale del substrato deve necessariamente rispondere ai requisiti di compliance meccanica, per adeguarsi alla forma della retina, e di resistenza alla penetrazione dell'acqua.

Poiché l'elettrodo tipicamente non ha circuiteria attiva, un ricoprimento ermetico non è richiesto. Ad ogni modo, la dissipazione di energia attraverso l'isolante deve essere minima e stabile, in quanto grandi dispersioni potrebbero determinare una stimolazione elettrica indiscriminata. Un comune approccio per elettrodi flessibili è l'utilizzo di un substrato polimerico, con il metallo interposto fra i due strati di polimero isolante, che possono essere resi molto sottili e plastici ma richiedono uno speciale trattamento e possono non essere compatibili con le procedure chirurgiche. Il comportamento elastico dei polimeri fa sì che essi possano essere stirati e manipolati senza frattura, sebbene il grado di deformazione dipenda dallo specifico polimero. Il poliammide è un substrato comunemente utilizzato, nonostante presenti problemi dovuti alla penetrazione dell'acqua e alla delaminazione nell'interfaccia poliammide-metallo. Recenti miglioramenti tecnologici legati alla fase di realizzazione, hanno ottimizzato notevolmente le proprietà e la durata del materiale. Altri polimeri proposti come substrato ed isolante per elettrodi flessibili sono: il PDMS (polidimetilsilossano), un materiale resistente alla temperatura, agli attacchi chimici, all'ossidazione, depositato tramite deposizione chimica da vapore e facilmente integrabile nei microsistemi, e il parilene, considerato una migliore barriera per l'acqua.

Nella fabbricazione di elettrodi, il platino è il metallo che è stato maggiormente impiegato per la stimolazione neurale. Tuttavia alcuni studi hanno rilevato la dissoluzione degli elettrodi durante la stimolazione in vivo. Un aumento della concentrazione di platino è stato osservato fra 4,5 h (4-20 ng Pt/sito di stimolazione) e 9 h (50-339 ng Pt/sito di stimolazione) di

stimolazione a $0,1 \text{ mC/cm}^2$, con gran parte del platino localizzato nel tessuto di incapsulamento associato agli elettrodi. Dato che verrà utilizzato un sottile film metallico e che la corrente pulsante, anche con carica bilanciata, provoca la dissoluzione del platino, è dubitabile che un sottile strato di platino resisterà ad anni di stimolazione. Pertanto ogni elettrodo in platino per la stimolazione cronica deve disporre di materiale sufficiente per durare in queste condizioni. Stime della densità di carica per stimolazioni sicure per il platino variano da $0,1 \text{ mC/cm}^2$ a $0,35 \text{ mC/cm}^2$. Alternative al platino prevedono materiali come l'ossido di iridio e il nitrato di titanio. Entrambi possiedono limiti di stimolazione più elevati (IrOx: $1-4 \text{ mC/cm}^2$; TiN: $0,9-22 \text{ mC/cm}^2$) ma non sono stati impiegati nei dispositivi medicali così estensivamente come il platino. Questa mancanza di implementazione è spiegata dal fatto che la maggior parte dei dispositivi di stimolazione neurale oggi in uso utilizza grandi elettrodi e richiede densità di corrente relativamente basse. In contrasto, un array per la stimolazione della retina può necessitare di 1000 elettrodi in uno spazio di $5 \times 5 \text{ mm}$. Sarà dunque necessario un elettrodo con un diametro di $100 \mu\text{m}$. Risulterà una densità di carica di circa 1 mC/cm^2 se è richiesta una soglia di $50 \mu\text{A}$ per 1 ms , per una effettiva stimolazione. Pertanto un array per la stimolazione retinale necessiterà di un materiale per elettrodi diverso dal platino.

Il packaging e l'assembling dei dispositivi biomedici impiantabili pongono sfide importanti ai designers poiché non solo gli impianti devono rimanere funzionanti nel tempo, protetti dai fluidi corporei e capaci di comunicare con le loro periferiche, ma il corpo deve altresì essere difeso dai materiali utilizzati in microelettronica. Il packaging ermetico serve come barriera tra i circuiti ed i fluidi corporei. Sono stati proposti due principali schemi di packaging. Nel primo schema, una capsula viene al substrato del dispositivo o assemblato nel sistema. In questo modello, esiste un gap fisico fra il package e il chip; ciò aumenta tuttavia le dimensioni dell'intera unità. Nel secondo schema, viene impiegato un film sottile come materiale di copertura, dando origine ad un packaging che è delle stesse dimensioni del chip. Flessibilità, spessori contenuti, compatibilità con i processi di

fabbricazione sono i vantaggi offerti da quest'ultimo schema. Sono necessari passaggi ermetici per connettere i driver analogici di corrente all'interno del packaging con gli elettrodi di stimolazione esterni [23], [24], [25].

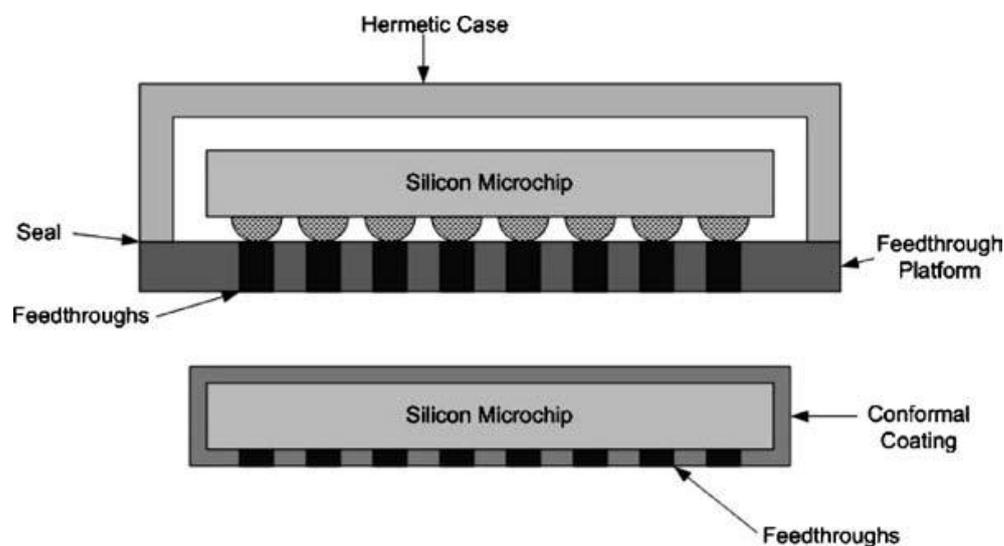


Figura 27 - Principali schemi per il packaging.

III. 2 SITI D'APPLICAZIONE DELLA PROTESI RETINALE

Gli impianti retinici artificiali si differenziano per la diversa collocazione anatomica dell'interfaccia elettrodo-neurone, ma sono accumulate dal medesimo obiettivo: stimolare elettricamente le porzioni della retina ancora vitali. Ciò che caratterizza questo genere di protesi è la retinotopia, proprietà per cui l'immagine viene trasmessa attraverso gli strati della retina senza subire eccessive distorsioni di forma.

La protesi epiretinale è applicata sulla superficie retinica più interna a diretto contatto con lo strato delle cellule gangliari. Questo tipo di dispositivo ha lo scopo di ripristinare la funzione visiva attraverso la stimolazione elettrica della retina in corrispondenza dello strato delle cellule gangliari. Il suo limite è la perdita di pre-elaborazione del segnale che

avviene nel passaggio fra i diversi livelli retinici. È necessario pertanto il supporto di un dispositivo esterno di pre-elaborazione.

La protesi subretinale è posizionata nella zona compresa fra l'epitelio pigmentato e lo strato più esterno della retina in sostituzione dello strato di fotorecettori. In questo modo si vanno a stimolare le cellule bipolari. L'impianto subretinale è composto da un sola unità, non essendovi alcun bisogno di una pre-elaborazione dell'immagine [23].

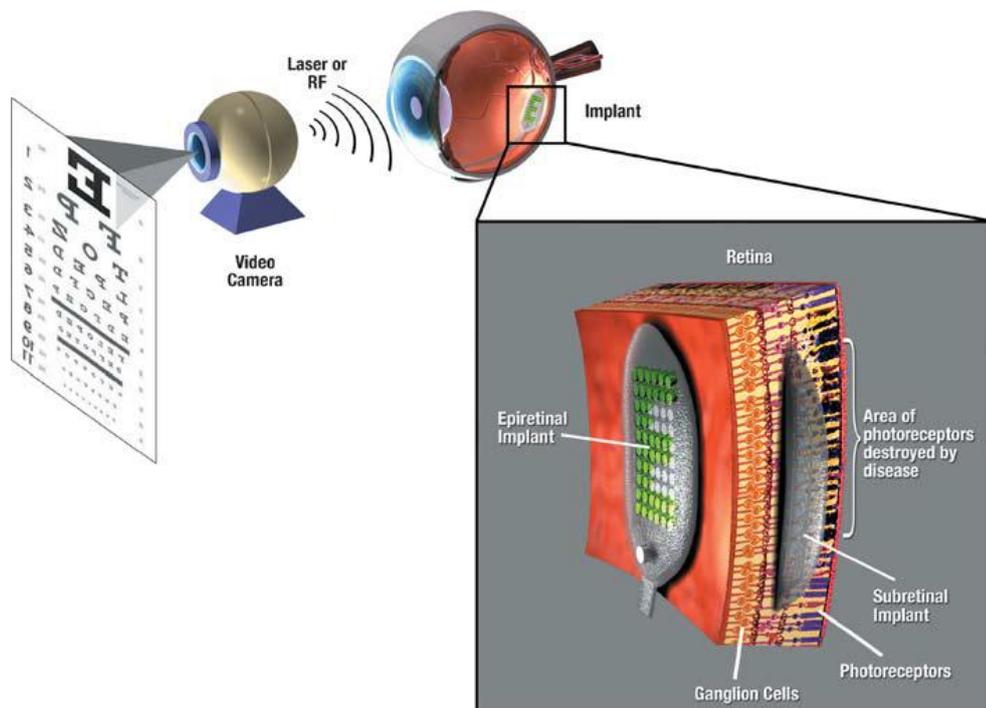


Figura 28 - La protesi retinica cattura l'immagine grazie ad una videocamera. L'immagine viene elaborata e trasmessa all'unità impiantata, che possiede il sottosistema necessario alla ricezione del segnale e alla trasmissione dello stimolo artificiale alla retina. L'array di elettrodi è collocato sulla superficie epiretinale o subretinale.

II. 2.1 Stimolazione epiretinale

La protesi epiretinale è composta da un'unità esterna di acquisizione ed elaborazione dell'immagine, da un'unità impiantata di stimolazione e da un sistema di trasmissione tra le due unità.

Una telecamera miniaturizzata, montata su un paio di occhiali e alimentata da una batteria esterna, ha il compito di registrare la scena circostante.

L'immagine catturata viene digitalizzata, cioè rielaborata in termini di treni di impulsi elettrici, ed inviata ad un DSP (digital signal processor), dove viene trattata con algoritmi che simulano i processi di pre-elaborazione che avvengono nella retina. Il segnale in uscita dal DSP viene trasferito al dispositivo impiantato mediante trasmissione a radio frequenza o trasmissione ottica. Il segnale ricevuto viene demodulato ed inviato al chip di stimolazione che genera gli impulsi di corrente e tramite un circuito di demultiplexing li indirizza ai singoli elettrodi, i quali andranno a stimolare direttamente gli assoni delle cellule gangliari. Dal nervo ottico l'informazione procede verso la corteccia visiva attraverso le normali vie di trasmissione nervosa.

Uno dei primi progetti di protesi epiretinale è nato a metà degli anni '90 grazie alla collaborazione tra la Johns Hopkins University e la North Carolina State University, dall'idea di un gruppo di ricercatori guidato dal Professor Wentai Liu e il Dottor Mark S. Humayun, e prende il nome di protesi **MARC**. La prima protesi realizzata, MARC1, presentava un electrode-array di 2x2 mm a 25 elettrodi disposti in una griglia 5x5 e poteva fornire solo la visione del bianco e del nero. Successivamente fu possibile progettare una protesi MARC2, con una griglia di elettrodi 10x10, per consentire una migliore qualità della visione. Nel 2002 cominciò lo sviluppo di una protesi MARC3 con una griglia di elettrodi 25x25 e con la possibilità di riconoscere 4 tonalità di colore: bianco, nero e due tonalità di grigio. Oltre ai vantaggi relativi alla progressiva miniaturizzazione, le nuove protesi progettate dopo MARC1 permettevano di ottenere una migliore dissipazione del calore, una migliore funzionalità e ricezione delle onde luminose e una riduzione dello stress retinico. Gli esperimenti condotti furono di notevole utilità per fissare dei parametri di stimolazione idonei per l'evocazione di immagini: si stabilì di usare impulsi di corrente di ampiezza compresa fra 100 e 600 μA e di durata compresa fra 0.1 e 2 ms, con una frequenza di stimolazione fra i 10 e i 125 Hz. I traguardi raggiunti dal progetto MARC sono serviti come base per la realizzazione della protesi Argus.

Un nuovo team di ricerca, chiamato Intraocular Retinal Prosthesis Group, con sede presso il Doheny Retina Institute della University of Southern California, nato dalla collaborazione tra il Dottor Humayun e il Dottor Eugene de Juan, ha provveduto alla progettazione di un dispositivo all'avanguardia per il ripristino della visione. Affidandosi alla compagnia privata Second Sight Medical Products (California), è stato sviluppato l'impianto epiretinico **ARGUS**, il cui principio di funzionamento è analogo a quello della protesi MARC.

Argus I prevede una componente interna formata da array di 16 elettrodi di platino, di misura 250-500 μm , posizionati chirurgicamente sulla fovea. Il range di stimolazione degli elettrodi è stabilito fra 24 e 702 μA , prevalentemente minore di 50 μA . L'unità extraoculare consiste in una piccola videocamera montata su un paio di occhiali, usata per recepire le informazioni visuo-spaziali che saranno trasformate in immagini a pixel mediante un'unità di visual processing. I dati e l'alimentazione sono trasmessi da un sistema di collegamento telemetrico induttivo ad anello magnetico impiantato nell'area temporale del cranio. Il segnale elettrico viene trasportato mediante un cavo che attraversa la sclera, connettendosi all'array di elettrodi. Dal 2002 al 2004 l'Intraocular Retinal Prosthesis Group ha effettuato 6 impianti in pazienti colpiti da cecità in seguito a degenerazione dei fotorecettori della retina, con risultati promettenti. I soggetti erano in grado non solo di distinguere tra luce e buio, ma anche di avere cognizione della direzione di moto, contare, localizzare e differenziare oggetti discreti in un ambiente.

L'ottimizzazione e il perfezionamento della protesi hanno portato allo sviluppo di una seconda generazione di protesi epiretinale, prodotta dalla Second Sight, chiamata Argus II. Nel 2007 la US Food & Drug Administration ha approvato l'esecuzione di studi clinici su umani della seconda generazione di protesi epiretinica, fino a ottenere, nel 2013, la concessione per la commercializzazione. Argus II ha ricevuto il marchio CE nel 2011 ed è ora disponibile in commercio in Unione Europea. La protesi presenta un array di 60 elettrodi, con dimensioni ridotte a circa un quarto

rispetto al primo esemplare, ed è stata impiantata fra il 2007 e il 2009 in 30 pazienti con RP o AMD in stato avanzato, negli undici centri mondiali, evidenziando notevoli benefici. Nel 67% dei casi la protesi ha prodotto effetti positivi, dimostrando stabilità e sicurezza. Gli individui hanno riscontrato un incremento dell'acuità visiva e della mobilità, dalla sola percezione della luce al motu mano e al conteggio delle dita; a livello di orientamento e localizzazione degli oggetti, sono risultati miglioramenti nella precisione e nella ripetibilità delle attività motorie spaziali. I pazienti non hanno denunciato reazioni di infiammazione, neovascolarizzazione o incapsulamento degli elettrodi.

Il modello Argus II dispone di un'apparecchiatura esterna che comprende gli occhiali, in cui alloggia la videocamera, un'unità di elaborazione video (VPU), ed un cavo. La videocamera raccoglie l'immagine e trasmette il segnale al VPU, un piccolo processore indossato dal paziente, in grado di convertire gli impulsi visivi in stimolazioni elettriche. Le istruzioni vengono inviate nuovamente agli occhiali, equipaggiati da un'antenna, che trasferisce i dati e l'alimentazione necessaria via wireless attraverso la pelle fino all'ASIC (application specific internal circuit) dell'unità impiantata. Qui, il ricevitore inoltra il segnale al chip stimolatore, collegato alla matrice di 60 elettrodi, in prossimità della macula. Gli elettrodi, disposti in una griglia 6x10, misurano 200 μm in diametro e sono distanziati da spazi di 575 μm . L'attivazione di un microelettrodo equivale alla stimolazione di centinaia di fotorecettori. Gli impulsi elettrici provenienti dall'array epiretinico bypassano i fotorecettori degenerati e stimolano le cellule sane rimanenti della retina, che trasportano l'informazione visiva lungo il nervo ottico, fino al cervello, creando la percezione di motivi luminosi, in modo coerente con la mappa retinotopica.

La protesi è fissa, l'impianto resterà sulla retina per il resto della vita del paziente. Tuttavia il software che regola l'elaborazione delle immagini è in continuo sviluppo e si possono ottenere miglioramenti delle performance visive, mediante l'implementazione di avanzate strategie di vision processing, zooming, eye scanning, color coding. Second Sight sta

sviluppando una nuova VPU, con occhiali più piccoli e dotata di un processore più veloce e performante. La protesi di next generation della Second Sight Medical Product prevede un impianto con 240 elettrodi, finalizzato a garantire una migliore risoluzione dell'informazione visiva. Prosegue lo studio della funzionalità e della stabilità del dispositivo per poter ottimizzare in futuro gli aspetti relativi all'interazione elettrodo-elettrodo e all'interfaccia elettrodo-tessuto [19], [26],[27] [32], [34].



Figura 29 - Sistema dell'impianto epiretinale Argus II: unità interna (in alto) ed unità esterna (in basso).

Un ulteriore impianto epiretinico simile ad Argus II è stato sviluppato dalla collaborazione tra la Aachen University Clinic e la Fraunhofer Institute Microelectronics in Germania e prende il nome di **Epi-Ret3**. Il sistema presenta una componente extraoculare che include una camera CMOS e un processore portatile con un software di stimolazione, un'unità di trasmissione e una bobina trasmittitrice, inseriti in una speciale montatura simile a degli occhiali.

La porzione intraoculare è basata su un microcavo flessibile, con una bobina ricevente integrata, un array di 25 elettrodi stimolatori (di altezza 25 μm e

diametro 100 μm), un chip ricevitore e un chip stimolatore. I componenti elettronici sono posizionati all'interno di una lente artificiale nella camera posteriore dell'occhio, mentre l'array di elettrodi è collocato al centro della retina. La trasmissione dell'alimentazione e dei dati avviene mediante accoppiamento induttivo a radio frequenza. A differenza degli altri dispositivi epiretinici, Epi-Ret3 è interamente impiantato all'interno dell'occhio senza fili elettrici che attraversano l'organo visivo, in modo da prevenire reazioni infettive o eccessivi stress meccanici; comporta inoltre un tempo di operazione chirurgica relativamente breve.

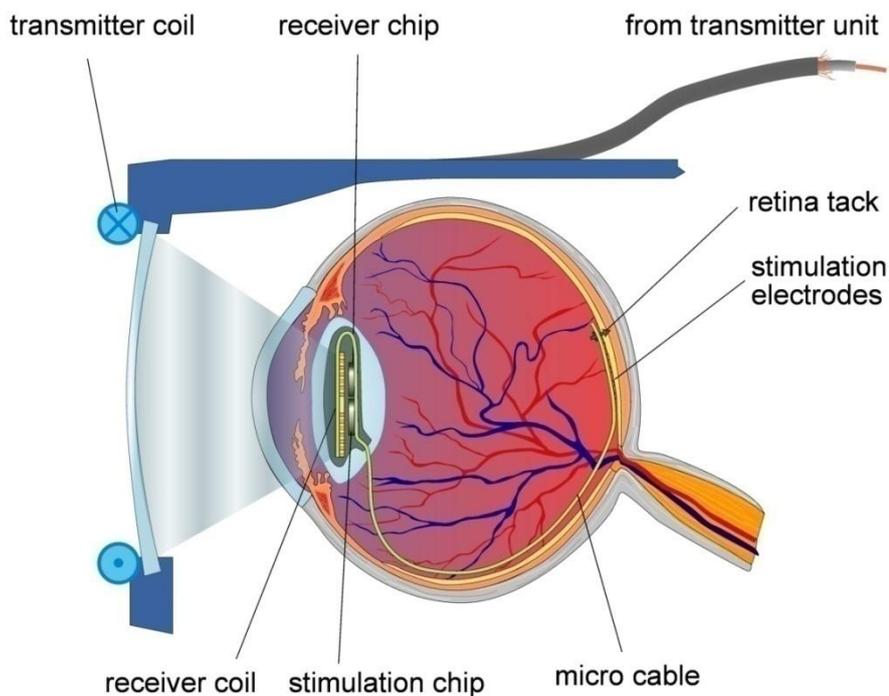


Figura 30 - Il sistema epiretinale Epi-Ret3.

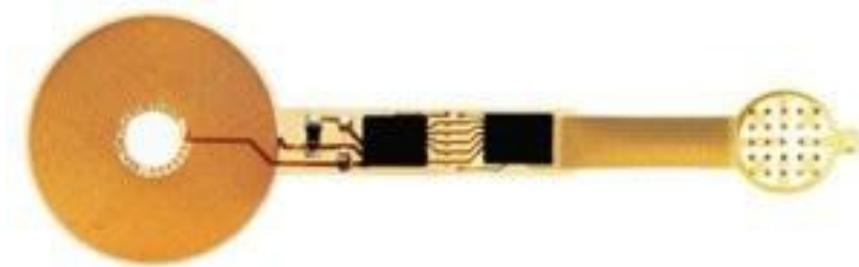


Figura 31 - Prototipo dell'impianto Epi-Ret3.

Test in vivo e in vitro hanno mostrato che l'impianto è funzionale fino ad una distanza di 25 mm fra la bobina trasmittente e quella ricevente, anche durante il movimento degli occhi.

Durante la stimolazione, sperimentata nel 2007 su 6 pazienti, per 4 settimane, i soggetti hanno riportato una sensazione visiva riuscendo a distinguere punti, linee, archi gli interventi chirurgici di impianto della protesi sono stati condotti con successo evidenziando una tolleranza del sistema biologico al dispositivo, stabile per tutto il periodo di prova [32], [38].

III. 2.2 *Stimolazione subretinale*

Un impianto di protesi subretinale ha lo scopo di sostituire i fotorecettori della retina persi o danneggiati, per mezzo di fotodiodi ed elettrodi. Il dispositivo deve fornire un segnale analogico allo strato delle cellule bipolari, che viene poi elaborato e convertito dagli strati neurali retinici prima che questi lo trasmettano, attraverso il nervo ottico, alla corteccia visiva. Viene assunto che il circuito delle cellule bipolari, gangliari, orizzontali ed amacrine sia integro.

Il fine è rimpiazzare i coni e i bastoncelli mal funzionanti inserendo, fra la sclera e lo strato delle cellule bipolari, una piastrina di silicio dotata di microfotodiodi, trasduttori fotosensibili, dove la radiazione luminosa incidente è assorbita e trasformata in potenziali elettrici. Ciascun microfotodiodo è collegato ad un elettrodo di stimolo; la luce modula direttamente i microfotodiodi, che inducono gli elettrodi a generare una corrente sufficiente ad attivare le cellule retiniche nervose adiacenti, dando origine alla sensazione visiva.

Gli array di microfotodiodi sono fabbricati in wafer di silicio, con spessore compreso fra i 25 e i 100 μm e diametro fra i 2 e i 3 mm, usando una tecnologia CMOS. Nel componente subretinico alcune migliaia di microfotodiodi sensibili alla luce, in grado di funzionare in modo indipendente e provvisti di microelettrodi in oro o nitruro di titanio, sono disposti sul wafer e collocati nello spazio subretinico [22], [23], [32].

L'Obtobionics Corporation è stata la prima compagnia a sviluppare un dispositivo subretinico, grazie all'idea di due fratelli di Hong Kong emigrati negli USA, l'ingegnere elettronico Vincent Chow e l'oculista pediatrico Alan Chow, che hanno battezzato la protesi visiva da loro progettata con il nome di Optobionics **Artificial Silicon Retina (ASR)**.

La ASR nasce con l'obiettivo di compensare i meccanismi sensoriali e recettoriali dei coni e dei bastoncelli andati persi, impiantando un MPA, un array di microfotodiodi, in grado di scaricare impulsi di corrente opportuni in risposta agli stimoli luminosi. L'ASR è costituita da uno strato di silicone, che consente un migliore adattamento dell'occhio al meccanismo di percezione della luce, sul quale è applicato, con materiale adesivo di titanio, uno strato di elettrodi, in platino e ossido d'iridio. Il MPA è una struttura indipendente che non richiede nessuna alimentazione esterna per il proprio funzionamento, traendo passivamente energia dalla luce solare incidente. L'array di microfotodiodi misura 2 mm in diametro e 25 μm in spessore ed è composto da 5000 microfotodiodi, ciascuno collegato al proprio elettrodo di stimolo. Il vantaggio della protesi è dato dalla possibilità di rimpiazzare i fotorecettori danneggiati senza la necessità di impiegare telecamera e sistemi di processamento dati esterni. La sperimentazione umana di ASR è stata approvata dalla Food & Drug Administration nel 2000; i pazienti che hanno ricevuto l'impianto non hanno riportato reazioni di intolleranza al sistema artificiale, mostrando invece di beneficiare di effetti neurotrofici e neuroprotettivi, che hanno indotto un parziale recupero della funzionalità retinica. Una possibile difficoltà di questa tecnica risiede tuttavia nel sistema di alimentazione: i microfotodiodi, stimolati direttamente dalla luce ambientale, non raggiungono un sufficiente livello di energia ad attivare i neuroni adiacenti. L'array di microfotodiodi è in grado di generare una corrente dell'ordine dei nano ampere (10^{-9} A), mentre la retina interna richiede una soglia di 10^{-6} A per essere attivata [21], [22], [32].

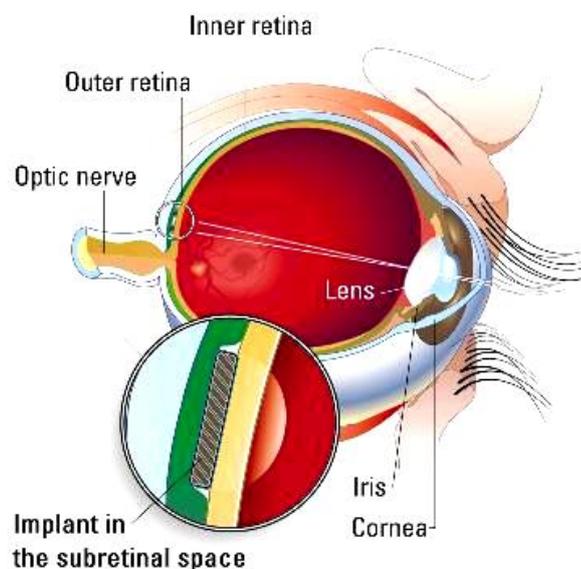


Figura 32 - *Locazione dell'impianto subretinale ASR.*

Prototipi creati in Germania nel 1996 presso lo Stuttgart-based Institute of Microelectronics nell'ambito del "Subretinal Implant Project" contenevano inizialmente 7000 elettrodi disposti su un disco del diametro di 3 mm e spessore 50 μm . Ogni fotodiodo occupava un'area di 20x20 μm , in modo da ottenere una densità di fotodiodi paragonabile a quella dei fotorecettori nella periferia della retina. Gli elettrodi erano realizzati in oro, con diametro di 10 μm , disposti su una superficie di silicio, permeabile alla luce ma buon isolante elettrico. Gli impianti furono testati in modelli animali ma i risultati dimostrarono che l'energia generata dai microfotodiodi non era sufficiente. La necessità di una sorgente energetica supplementare esterna ha condotto al perfezionamento della protesi. Noto come **Alpha-IMS** e sviluppato dalla Retinal Implant AG (Reutlingen), il dispositivo presenta tre componenti: una subretinale, una extraoculare ed una subdermale. L'unità subretinale è caratterizzata da una disposizione 4x4 di array di elettrodi di nitruro di titanio e un array di microfotodiodi, con 1550 fotodiodi posti sulla fovea. La sezione extraoculare è formata da 22 linee di connessione d'oro che forniscono la connessione esterna degli elettrodi di riferimento. La componente subdermale consiste in un cavo di silicone che arriva fino allo

spazio retro auricolare, dove si connette con un'unità di controllo che eroga la potenza necessaria.

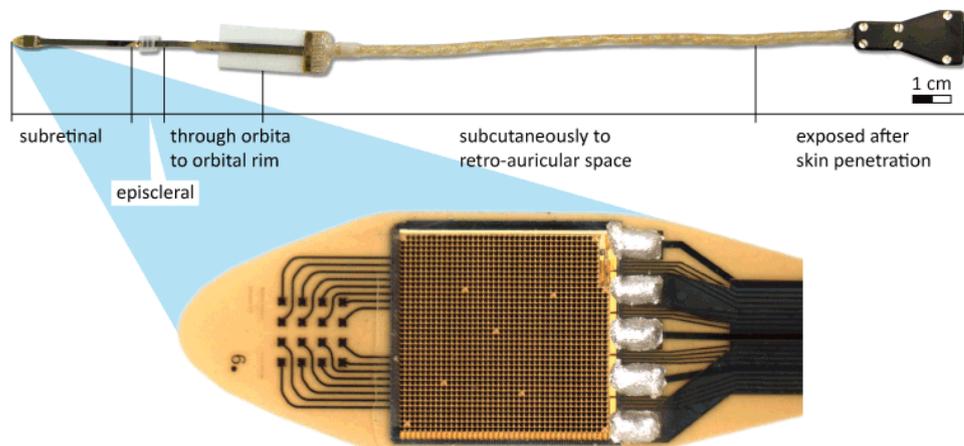


Figura 33 - Alpha-IMS (Retinal Implant AG).

L'array di micro fotodiodi (MPDA) è un chip CMOS sensibile alla luce di dimensioni 3.0x3.1 mm con 1500 elementi generanti pixel, collocati su una lamina poliammidica spessa 25 μm , sulla quale è innestato un campo di verifica, composto da 16 array di elettrodi per una stimolazione elettrica diretta (DS test field), indipendente dalla luce. Il campo test DS è stato aggiunto per la valutazione delle caratteristiche elettrodo-interfaccia e per studiare l'efficacia di impulsi di corrente con differenti forme e polarità, rispetto a quelli forniti dal MPDA. Ciascuno dei 16 array è formato a sua volta da 4 elettrodi in nitruro di titanio.

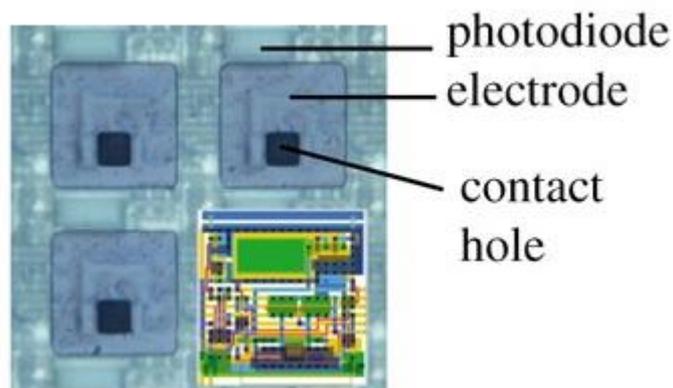


Figura 34 - Particolare di 4 elementi.

Ognuno dei 1500 elementi agisce in modo indipendente ed include un fotodiodo sensibile alla luce (15x30 μm), che controlla un amplificatore, la

cui uscita è accoppiata ad un elettrodo in nitruro di titanio (50x50 µm), connesso all'amplificatore per mezzo di un buco di contatto. Ogni elemento genera impulsi di potenziale anodici monofase al proprio elettrodo; il segnale viene amplificato linearmente fino a 2,3 V così da fornire una corrente di stimolazione proporzionale all'intensità della luce incidente su ogni elemento.

Essenzialmente un'immagine è catturata simultaneamente più volte al secondo da tutti i fotodiodi. Così, le stimolazioni ripetitive pixelizzate sono fornite contemporaneamente da tutti gli elettrodi al gruppo delle cellule bipolari adiacenti. La quantità di corrente fornita da ogni elettrodo dipende dalla sensibilità di ogni fotodiodo.

Impiantata in 12 soggetti con RP per 4 settimane, la protesi ha prodotto un miglioramento nella localizzazione e nella distinzione di individui, forme geometriche e lettere. Essa ha ottenuto il marchio CE nel giugno 2013 [28].

Dopo quasi un decennio di lavoro sulla stimolazione epiretinale, il Boston Retinal Implant Project (BRIP), fondato nel 1980 dal dottor Joseph F. Rizzo, ha scelto l'approccio subretinale per l'impianto di array di elettrodi, in grado di stimolare le cellule retiniche residue in soggetti ciechi o ipovedenti. Le ragioni che hanno spinto il BRIP a cambiare approccio sono le seguenti: minimizzare l'ingombro dell'impianto rispetto all'anatomia oculare, utilizzare metodi chirurgici ab externo meno invasivi, ridurre il volume e la quantità dei componenti elettronici impiantati, impiegare substrati sottili e flessibili che si adattino facilmente alla curvatura dell'organo visivo, controllare ed aggiustare i parametri di stimolazione, connettere le unità interna ed esterna mediante tecnologia wireless, proteggere i microcircuiti interni dall'ambiente biologico e assicurare la biocompatibilità a lungo termine del dispositivo. L'impianto realizzato nella seconda generazione del BRIP prende il nome di **Hermetic Retinal Prosthesis** ed include una struttura ermetica in titanio che protegge un chip stimolatore a 15 canali e un componente circuitale aggiuntivo. La capsula è collegata ad un anello ricevitore che ha il compito di acquisire le informazioni e l'alimentazione necessaria al funzionamento.

Il circuito esterno contiene un controllore dotato di un' interfaccia utente per selezionare gli elettrodi da attivare. Le informazioni in uscita dal controllore sono inviate ad un amplificatore di potenza che le trasmette via wireless all'impianto. I dati sono codificati da un ASK (amplitude shift keying) o codificatore di potenza. Anche l'alimentazione è trasferita in modalità wireless e rettificata dall'impianto per creare una tensione di alimentazione di $\pm 2,5$ V. Il circuito integrato interno è un circuito CMOS, delle dimensioni di $0,5 \mu\text{m}$, che riceve e codifica le informazioni entranti e genera la corrente di stimolazione agli elettrodi appropriati, in base al tempo del comando di trasmissione. Il chip è in grado di apportare oltre $930 \mu\text{A}$ di corrente per canale, usando un convertitore DAC. La corrente tipicamente apportata agli elettrodi è compresa fra i 30 e i $120 \mu\text{A}$. Il package contenente il chip è ancorato all'esterno del bulbo oculare e la sua corrente elettrica di stimolazione è trasmessa alle cellule nervose retiniche mediante un fine film di array di elettrodi rivestiti da ossido d'iridio, inserito chirurgicamente nello spazio subretinico attraverso un'incisione nella sclera. Il case di titanio misura $11 \times 11 \times 2$ mm ed ha forma tale da conformare la curvatura anatomica dell'occhio.

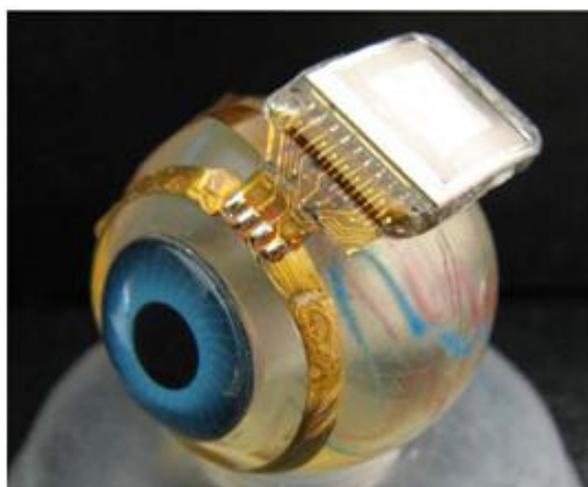


Figura 35 - Hermetical Retinal Prosthesis

La capsula è collegata mediante 40 linee d'oro agli anelli che alloggianno sulla congiuntiva: l'anello primario, di raggio 19 mm, è posto di fronte

all'occhio e serve principalmente per l'alimentazione, l'anello secondario, di raggio 12,5 mm, ha il compito di ricevere i dati ed è separato dall'anello primario per mezzo di un corpo polimerico (polidimetilsilossano), modellato per adattarsi alla forma oculare. L'immagine ottenuta da una camera esterna è convertita in segnale elettromagnetico e inviata via wireless dall'anello primario, posto su un paio di occhiali, all'anello secondario collocato sulla sclera [20], [29], [30].

III. 3 PROTESI DEL NERVO OTTICO E PROTESI CORTICALI

Nei soggetti ciechi, che preservano la funzionalità delle cellule gangliari della retina, il nervo ottico è un possibile sito di impianto di elettrodi per la neurostimolazione elettrica, sebbene trovare l'esatta distribuzione retinotopica interna sia una sfida difficile. Un bracciale di elettrodi avvolti a spirale applicato attorno al nervo ottico, impiantato cronicamente, ha dimostrato di produrre nei pazienti la capacità di distinguere semplici caratteri su uno schermo e di localizzare oggetti. In alternativa, l'inserimento di elettrodi a penetrazione nel nervo ottico e nel disco ottico, è in grado di generare la percezione di fosfeni. La stimolazione del nervo ottico rimane tuttavia svantaggiosa a causa della delicatezza del sito di applicazione degli elettrodi, la cui pressione è potenzialmente dannosa per la via nervosa. L'elevata densità degli assoni rende difficile la stimolazione focale e la percezione dettagliata degli stimoli e qualsiasi approccio chirurgico al nervo ottico richiede la dissezione della dura madre, comportando possibili side-effects.

La prima strategia ad essere stata ideata per il recupero della funzione visiva in pazienti non vedenti considera, come sede di applicazione dell'impianto artificiale, la corteccia cerebrale, scegliendo la stimolazione diretta dell'area visiva, responsabile della formazione delle immagini, per la capacità corticale di adattare continuamente l'attività nervosa in risposta ai cambiamenti degli stimoli visivi. Sfruttando tale proprietà, detta plasticità

neuronale, la protesi corticale intende indurre il cervello a “reimparare a vedere” facendo in modo che i fosfeni evocati rappresentino sempre più fedelmente il mondo reale.

La struttura funzionale della protesi corticale, adatta per il trattamento di tutte le patologie che interessano la via di trasmissione visiva, prevede l'utilizzo di una telecamera e di un'unità di elaborazione dati esterne, collegate ad un chip e ad un array di microelettrodi impiantati a livello corticale.

Il primo esperimento di stimolazione elettrica della corteccia visiva fu condotto nel 1968 da Giles Brindley presso l'università di Cambridge; egli stimolò elettricamente la corteccia visiva di alcuni volontari ciechi tramite l'impianto di un array di 80 elettrodi. Esperimenti simili furono condotti in seguito da W. H. Dobelle presso la University of Utah. Egli ne dedusse che inviando corrente ad un singolo elettrodo si ha da parte del paziente la percezione di un fosfene, somministrando corrente a più elettrodi contemporaneamente il soggetto avverte più fosfeni distinti. La posizione dei fosfeni nel campo visivo rispecchia abbastanza fedelmente la posizione degli elettrodi in corteccia. Due stimoli distinti danno origine a due fosfeni distinti se la distanza fra i due elettrodi non è inferiore a 250-500 μm . Lo stesso Dobelle riuscì, nel gennaio 1999, a ristabilire un'acuità visiva di 1/20 in un paziente totalmente cieco da 20 anni, mediante un impianto corticale. Il dispositivo ideato da Dobelle rappresenta il primo rilevante tentativo di ripristino della visione, volto a consentire l'indipendenza di movimento ai pazienti non vedenti. La protesi utilizza 64 elettrodi piatti che ricevono impulsi da un generatore, sotto il controllo di un piccolo computer. I dati sono forniti da una videocamera miniaturizzata e da un sensore ad ultrasuoni, utilizzato per il calcolo delle distanze.

L'immagine acquisita dalla videocamera viene convertita dal processore in una serie di segnali elettrici, che giungono all'array di elettrodi. L'elettrode array è posizionato a contatto con la superficie della corteccia occipitale attraverso l'impianto transcranico che stimola la regione corticale producendo uno specifico pattern di punti luminosi che formano

l'immagine. Gli elettrodi sono circolari di diametro 1 mm e realizzati in platino; ciascuno di essi è collegato ad un connettore contenuto in un supporto percutaneo in carbonio (il percutaneous pedestal). I fili che lasciano il computer si connettono per mezzo di una spina elettrica al percutaneous pedestal.

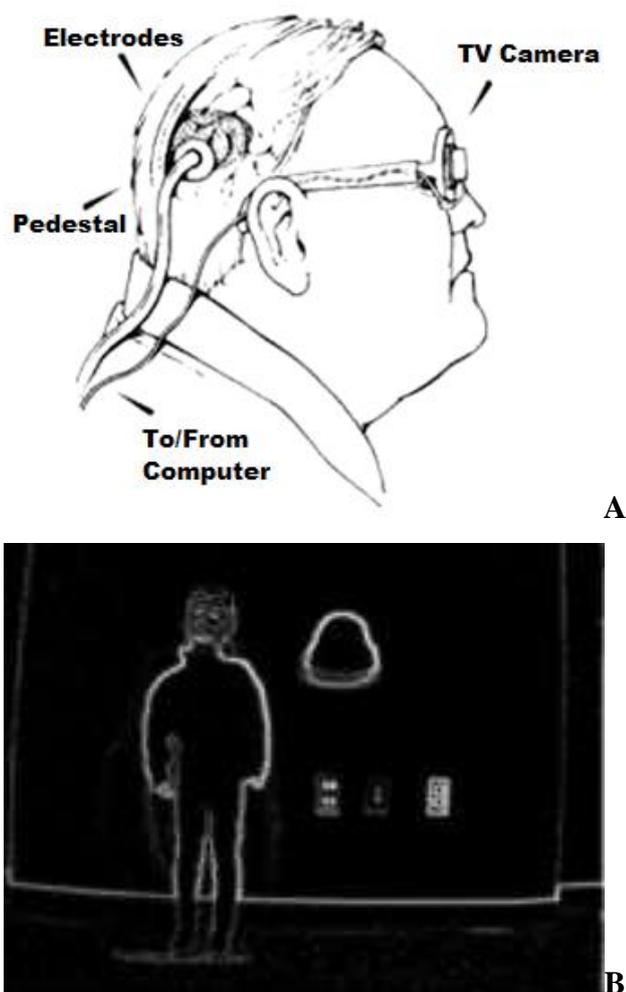


Figura 36 - A) L'impianto corticale di Dobelle; B) La percezione dell'immagine.

Gli impianti corticali possono beneficiare della presenza del liquido cerebrospinale, che è in grado di rimuovere il calore dissipato dall'area dell'impianto.

L'immagine che si ottiene con questo tipo di stimolazione è abbastanza definita per permettere al paziente di muoversi nello spazio e percepire la

forma e la posizione degli oggetti, ma non è possibile ottenere una qualità dell'immagine ottimale, che garantisca la lettura di un testo o la visione a colori. Nelle protesi più recenti si sta tentando di migliorare la qualità della visione, aumentando il numero di elettrodi per array, e di limitare i problemi legati alla sovrastimolazione.

Il modello corrente di protesi corticale, sviluppato dall'Illinois Institute of Technology (IIT), consiste in un impianto interno dotato di una matrice di 100 microelettrodi organizzati in una griglia contenuta in un package di dimensioni 4.2x4.2 mm, che prende il nome di Utah Electrode Array. Gli elettrodi sono composti da un film di ossido d'iridio, ritenuto un mezzo conduttore ideale, scolpiti col laser e resi a punta fine in modo da minimizzare i danni dovuti alla loro inserzione nella corteccia. I dati provenienti da una telecamera esterna bypassano la strada visiva primaria del cervello e vengono trasmessi direttamente all'impianto intracorticale. In seguito all'approvazione ricevuta dalla Food and Drug Administration, l'Utah Electrode Array è stato impiantato in alcuni soggetti umani e rimosso dopo 30 minuti, senza danni.

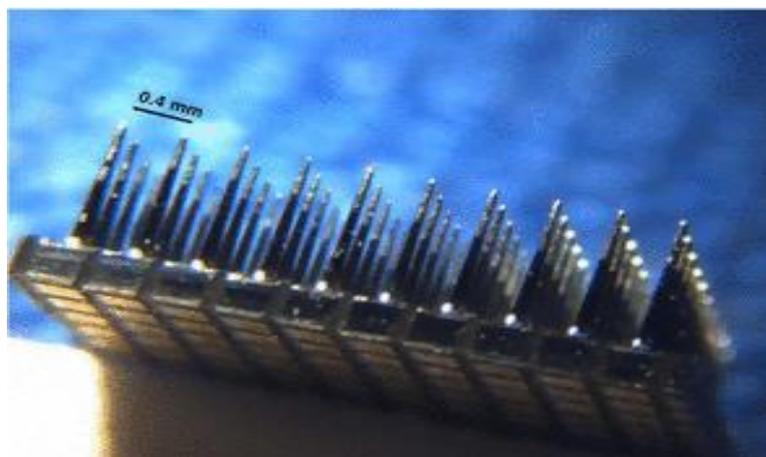


Figura 37 - Utah Electrode Array.

Nonostante la maggior facilità di impianto del dispositivo corticale rispetto alle protesi retiniche, data la relativa semplicità di accesso alla corteccia visiva, il principale svantaggio di questa applicazione è dovuta al fatto che non si conosce ancora bene il modo in cui farla interagire con il cervello

stesso. Nel cervello esistono milioni di interconnessioni che progettano le informazioni neuronali da inviare alla corteccia visiva, la quale le decompone negli elementi caratteristici della visione per trasmetterle a centri più alti di elaborazione, dando luogo alla percezione dell'immagine. Pertanto è difficile, in ogni livello, comprendere come creare e gestire le informazioni artificiali per generare la visione [22], [24], [31], [35].

III. 4 PROTESI RETINALI IBRIDE

La protesi retinale ibrida nasce dall'esigenza di favorire una connessione tra i neuroni del paziente e l'impianto, combinando componenti elettroniche e componenti cellulari. Essa è dotata di un'unità esterna di acquisizione ed elaborazione dell'immagine e da un'unità impiantabile di stimolazione. Ciò che differenzia questo genere di dispositivo da una protesi retinale è la coltura di neuroni ancorata all'array di elettrodi, i cui assoni dovrebbero stabilire una connessione sinaptica con le cellule del sistema nervoso del paziente. La connessione fra l'array di elettrodi e il tessuto nervoso del soggetto avviene per mezzo di un strato di neuroni, che vengono fatti crescere sull'array prima di procedere all'impianto, a formare un'interfaccia neuronale. L'array di elettrodi è costruito a partire da un substrato di silicio con tecnologia a film sottile; al fine di ottenere una migliore adesione fra i neuroni coltivati e gli elettrodi, l'array viene ricoperto da uno strato di collagene. Ipotizzando che l'interfaccia stabilisca contatto con i neuroni del nucleo genicolato laterale, questo dispositivo sarebbe utile anche per patologie che prevedono la perdita delle cellule gangliari e del nervo ottico, conservando al contempo i vantaggi in termini di intervento chirurgico. Il sistema retinale ibrido presenta tuttavia difficoltà nella direzione della crescita dei assoni dei neuroni di connessione. L'obiettivo è trovare un metodo per guidare i prolungamenti nervosi nella direzione voluta e indurli ad instaurare contatti sinaptici con altre cellule nervose. Non è assicurata la proprietà di retinotopia e la posizione spaziale dei fosfeni evocati, non in

corrispondenza con la mappa retinotopica, rende molto difficile la ricostruzione dell'immagine [22],[33].

IV. PROSPETTIVE DI FRONTIERA PER LA VISIONE ARTIFICIALE

La possibilità di stimolare artificialmente l'attività nervosa delle cellule vitali della retina interna e di sostituire gli strati dei fotorecettori in condizioni di degenerazione ha fornito le basi per lo sviluppo di protesi impiantabili, in grado di ripristinare parzialmente la sensazione visiva. La riabilitazione della funzionalità retinica è conseguibile mediante sistemi di registrazione e pre-elaborazione dell'immagine, che controllano un'unità interna di array di elettrodi, o mediante impianti fotorivelatori capaci di trasdurre l'energia luminosa in segnali elettrici. Le protesi di maggior successo, il dispositivo epiretinale Argus II (Second Sight Medical Products) e l'impianto subretinale Alpha (Retina Implant AG), hanno registrato risultati soddisfacenti ed hanno ottenuto l'autorizzazione dell'Unione Europea per la commercializzazione. Tuttavia le retine artificiali realizzate finora, basate sul silicio, devono affrontare e risolvere molti problemi comuni: la necessità di un'alimentazione esterna, la biocompatibilità a lungo termine, la complessità dei processi di fabbricazione, la difficoltà dell'intervento chirurgico, il numero di elettrodi, le dimensioni e la geometria, l'elevata impedenza, la produzione di calore. Ragioni per cui approcci bioingegneristici alternativi avanzano nel campo d'indagine della visione artificiale, al fine di migliorare la biocompatibilità dell'interfaccia macchina-tessuto biologico, recuperare la proprietà di fotosensibilità della retina mediante l'uso di materiali sensibili alla luce e modulare l'attività neuronale delle cellule tramite tecniche di fotostimolazione.

Le più comuni strategie finalizzate al controllo dell'attività elettrica in cellule eccitabili sono basate sulla stimolazione elettrica, come avviene nelle protesi retinali o cocleari, o chimica, mediante il rilascio di fattori di crescita, neurotrasmettitori o farmaci neuroattivi. Tuttavia, negli ultimi anni,

tecniche ottiche che utilizzano stimoli luminosi per sollecitare una risposta nervosa intracellulare stanno emergendo come valida alternativa, con vantaggi importanti rispetto ai metodi tradizionali, in particolare per la possibilità di raggiungere un elevato grado di risoluzione spaziale e temporale. Inoltre le tecnologie ottiche non sono invasive e consentono la regolazione dell'intensità e della lunghezza d'onda del segnale luminoso, in base al tipo di stimolazione che si intende applicare. L'eccitazione del tessuto nervoso indotta dalla luce può essere ottenuta direttamente con impulsi laser ad alta intensità o con illuminazione a radiazioni IR. La sensibilizzazione delle cellule alla luce per mezzo di cromofori esogeni è alla base di una scienza emergente, l'optogenetica: le cellule vengono rese sensibili alla radiazione luminosa mediante l'espressione genetica di proteine fotosensibili, in grado di modulare la loro attività biologica. Un interessante approccio, proposto nel 2012, presuppone la modulazione dell'attività neurale attraverso l'applicazione di molecole interruttore attivabili dalla luce, chiamate "photoswitch", che controllano la conducibilità dei canali del potassio.

La manipolazione dell'attività neuronale mediante l'uso di polimeri semiconduttori organici apre la strada a una nuova promettente prospettiva per la visione artificiale, che trae beneficio dalle caratteristiche di flessibilità, affinità biologica e fotosensibilità intrinseca dei materiali impiegati, per la realizzazione di interfacce bi organiche [39]

IV. 1 TECNICHE OTTICHE PER LA MODULAZIONE DELL'ATTIVITÀ NEURONALE

Nel 1957 Pierce e Giese furono i primi a dimostrare la possibilità di controllare otticamente l'attività neuronale. L'applicazione di radiazioni UV in cellule nervose di rana e granchio rivelava la riduzione dell'ampiezza dei potenziali d'azione, effetto che poteva essere successivamente invertito con la luce bianca. Lo sviluppo della tecnologia laser ha reso possibile la fotostimolazione dei neuroni con brevi impulsi laser, utilizzando radiazioni

ad alta energia, con lunghezze d'onda di 488 e 532 nm, appartenenti alla banda della luce visibile. L'interazione laser-tessuto provoca l'attivazione di cromofori e pigmenti, molecole endogene fotosensibili che assorbono la luce laser passando a uno stato eccitato. Si ha la generazione di specie reattive dell'ossigeno (ROS): l'energia immagazzinata dalle molecole endogene viene ritrasmessa istantaneamente ed assorbita dalle molecole di ossigeno, che passano ad uno stato molto reattivo. Il meccanismo che produce la formazione di ROS, probabilmente comporta l'inibizione dei canali voltaggio-dipendenti del potassio. Lo svantaggio di questo genere di fotostimolazione è dato dal fatto che la generazione di ROS porta rapidamente alla tossicità e alla morte delle cellule, pertanto occorre limitare l'esposizione delle cellule a questo tipo di stimolazione.

La stimolazione neurale a infrarossi (INS) utilizza impulsi di radiazioni IR, ad alta intensità, concentrabilità e profondità di penetrazione tissutale. La INS dipende dall'elevato assorbimento della luce infrarossa da parte dell'acqua, che è presente abbondantemente nei tessuti biologici e riveste un ruolo importante nell'interazione termica. Un piccolo impulso di luce infrarossa provoca infatti un locale innalzamento della temperatura, che può alterare la capacità della membrana plasmatica. La INS facilita la stimolazione a lunga durata di un singolo nervo senza danneggiare le strutture vicine, tuttavia non fornisce una risoluzione spaziale della singola cellula o di tipi specifici di cellule.

La fotostimolazione può essere impiegata anche per l'attivazione biochimica di molecole segnale, come neurotrasmettitori o calcio intracellulare. Inizialmente il complesso molecolare è inattivo e diventa funzionale con la fotolisi. Una volta rilasciato il composto attivo, ad esempio il glutammato, questo può raggiungere le proteine bersaglio e gli specifici recettori.

La scoperta di canali ionici sensibili alla luce, in alcune alghe, è stato il punto di partenza per lo sviluppo di un innovativo metodo di manipolazione dell'attività cellulare, che combina tecniche ottiche e genetiche e prende il nome di optogenetica. La tecnologia optogenetica utilizza la modifica per

via genetica delle cellule nervose, in modo tale che esse rispondano a determinati input luminosi, consentendo il controllo dell'attività dei neuroni semplicemente grazie alla luce. Essa prevede l'introduzione nel tessuto di un gene che codifica per canali ionici o pompe fotoattivabili, fra cui la proteina Canal-Rodopsina, con funzione eccitatoria, e la proteina Alorodopsina, con funzione inibitoria. L'inclusione di promotori per specifici tipi di cellule, che rispondono a differenti lunghezze d'onda, permette che l'espressione delle proteine fotoattivabili sia selettiva per il tipo cellulare desiderato. Secondo il tipo di opsina, illuminando una cellula si possono controllare precisi modelli di potenziale d'azione, ottenendo un abbassamento del potenziale e quindi l'inibizione dell'impulso nervoso attraverso il neurone oppure il suo innalzamento, che provoca la propagazione dell'impulso stesso.

I vari tipi di neuroni si distinguono per l'espressione caratteristica di particolari neurotrasmettitori e recettori, che permette loro una comunicazione mirata, precisa ed estremamente veloce. Grazie all'optogenetica è possibile controllare l'attività di una specifica popolazione di neuroni, mediante una manipolazione precisa al millisecondo e selettiva per gruppi cellulari scelti.

Per restituire sensibilità alle cellule retiniche, danneggiate da distrofia neurodegenerativa, e per modularne l'attività elettrica, una possibile strategia alternativa è data dall'applicazione di una molecola, che funziona come "photoswitch", poiché è in grado di cambiare conformazione in risposta ad una variazione dello stimolo luminoso. Il fotointerruttore (acrilammide-azobenzene ammonio quaternario, AAQ) viene isomerizzato dall'assorbimento della luce UV-blu, passando alla configurazione *cis*, che sblocca i canali del potassio, mentre viene riportato alla conformazione *trans* se illuminato con luce verde. La stimolazione *ex vivo* con luce UV-blu di una retina menomata ha dimostrato l'incremento dell'attività delle cellule gangliari, mediato dalla fotoregolazione dell'attività delle cellule amacrine. Il recupero dei riflessi pupillari e i test comportamentali effettuati sui ratti hanno confermato un ripristino della fotosensibilità anche in vivo. Rispetto

alle tecniche optogenetiche o agli impianti retinali, questo metodo ha il vantaggio di non richiedere alcuna complessità di intervento chirurgico o espressione genetica, poiché la molecola viene iniettata nella cavità vitrea dell'occhio. Tuttavia la sensibilizzazione della retina è reversibile e svanisce dopo 24 h dall'iniezione [39].

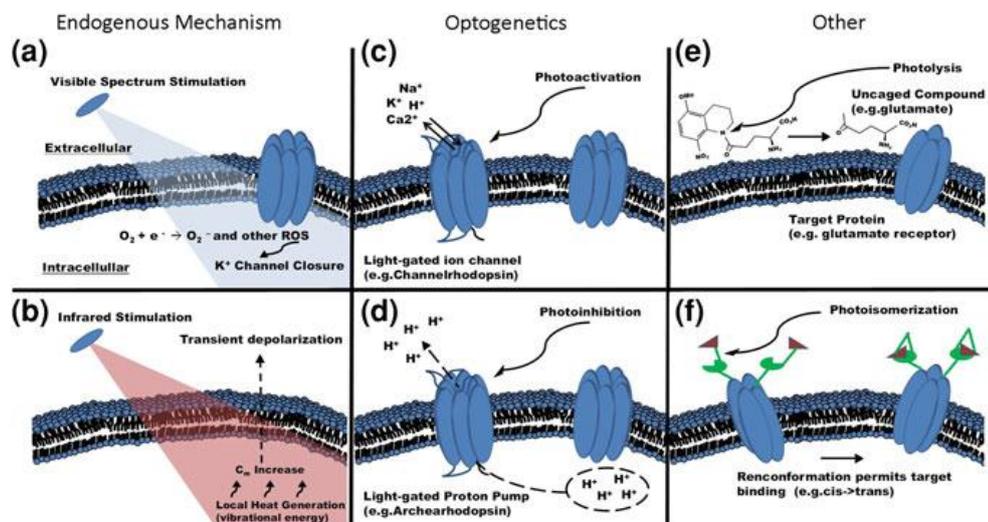


Figura 38 - Tecniche ottiche per la modulazione dell'attività neuronale: a) Stimolazione con luce visibile ad alta energia; b) Stimolazione con raggi IR; c) Fotoattivazione optogenetica; d) Fotoinibizione optogenetica; e) Fotolisi e rilascio di neurotrasmettitore; f) Isomerizzazione della molecola "photoswitch", che induce il legame ligando-recettore.

IV.1.1 L'optogenetica

La complessità del cervello dei mammiferi non ha confronti. Decine di miliardi di neuroni interconnessi, con infinite morfologie e schemi circuitali specifici, si scambiano segnali elettrici con una precisa scansione temporale nell'ordine dei millisecondi, oltre ai più diversi messaggeri biochimici. Questa complessità impedisce ai neuroscienziati di comprendere a fondo i meccanismi cerebrali e rende difficile lo sviluppo di tecniche adeguate per lo studio e la modulazione dei circuiti nervosi. La grande sfida delle neuroscienze sta nella capacità di controllare un solo tipo di cellula nel cervello senza influire sulle altre. La stimolazione elettrica è insufficiente perché gli elettrodi sono troppo approssimativi e stimolano tutte le cellule nella zona in cui sono inseriti senza distinguere i vari tipi cellulari. Inoltre, i

loro segnali non disattivano i neuroni con precisione. L'ipotesi di usare la luce come strumento di controllo, indirizzandola con impulsi di una certa frequenza nelle aree più diverse, fu avanzata dallo scienziato britannico Francis Crick (1916-2004), ma all'epoca non vi era idea di come rendere sensibili alla luce cellule specifiche.

Nel frattempo, nel campo della biologia, si indagava su microrganismi che solo molti anni dopo si sarebbero rivelati decisivi. Già dagli anni '70 i biologi avevano scoperto che alcuni microrganismi generano proteine che, in risposta alla luce visibile, regolano direttamente il flusso della carica elettrica attraverso la loro membrana.

Queste proteine, le opsine, sono proteine trans-membrana fotosensibili, che, quando sono illuminate, agiscono monitorando il trasporto trans-membranale di ioni carichi, responsabili della propagazione del segnale elettrico nella cellula. Opsine di tipo diverso possono variare per sensibilità alla luce e comportamento ed in base al tipo di opsina, con l'assorbimento di luce, si ha l'attivazione o l'inibizione dell'attività elettrica della cellula. I geni delle opsine sono alla base dell'optogenetica, una tecnologia impiegata nell'area delle neuroscienze per controllare l'attività neuronale in neuroni bersaglio.

Nel 1971, Walther Stoeckenius e Dieter Oesterhelt, che lavoravano all'Università della California a San Francisco, scoprirono che una di queste proteine, la bacteriorodopsina, agisce da pompa protonica a singolo componente, attivabile per breve tempo da fotoni di luce verde. Seguì l'identificazione di altri membri di questa famiglia di proteine, le alorodopsine e le canalrodopsine.

Negli anni '90 si svolsero le prime ricerche per sfruttare queste proteine nel controllo dei neuroni, con l'obiettivo di fornire a cellule nervose designate delle opsine che, attivate dalla luce, reagissero portando all'eccitazione o all'inibizione della cellula.

I fondamenti dell'optogenetica si devono al neuroscienziato Gero Miesenböck, che, nel 2002, fu il primo ad utilizzare metodi di fotostimolazione geneticamente mirata, in cui trovavano applicazione le

opsine prodotte da alghe e batteri, ingegnerizzate per attivare con stimolazioni luminose specifiche popolazioni di neuroni bersaglio. Nel 2005, il gruppo di Karl Deisseroth della School of Medicine della Stanford University propose l'utilizzo di un'opsina microbica, la Canalrodopsina-2, un singolo componente estratto dalle alghe, che si attiva con la luce dello spettro visibile mediante un cromoforo retinico già presente. La Canalrodopsina-2 venne introdotta nei neuroni di mammifero in coltura attraverso la tecnica della trasfezione, ovvero effettuando lo *splicing* (taglio e ricucitura) del gene per la ChR2 e di uno specifico interruttore on, o promotore, nei geni di un vettore, che traghettava nelle cellule il materiale genetico supplementare. I promotori possono garantire che solo tipi scelti di neurone esprimeranno le opsine codificate. L'utilità sperimentale della ChR2 per il controllo dei circuiti neuronali, venne verificata su diversi animali, dai mammiferi, ai vermi, al pesce zebra, dimostrando la capacità della proteina di attivare i neuroni mediante la luce e determinando il primo vero successo in campo optogenetico. Poco dopo, una seconda opsina, l'Alorodopsina (NaPH), venne impiegata con pari successo per inibire le cellule.

Introducendo un singolo gene di opsina di un microrganismo nei neuroni di un mammifero era dunque possibile far rispondere alla luce le cellule in modo preciso. Le opsine si dimostrarono capaci di attivare o disattivare i neuroni in modo efficiente come risposta alla luce e funzionavano perché il tessuto dei mammiferi contiene naturalmente quantità cospicue di all-trans-retinale, l'unico cofattore chimico essenziale affinché i fotoni attivino le opsine ricavate dai microrganismi. Fu sufficiente perciò aggiungere ai neuroni target solo il gene dell'opsina.

Il termine optogenetica si diffuse nel 2006 per identificare una metodologia ottica ad alta velocità utile a sondare e controllare geneticamente ed in modo mirato i neuroni all'interno di circuiti neuronali intatti [47].

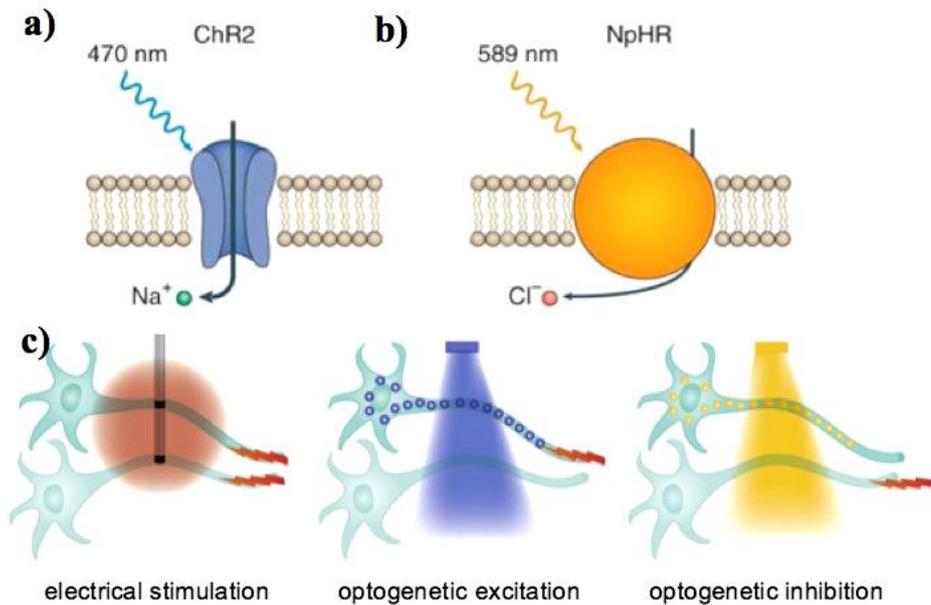


Figura 39 - L'eccitazione o l'inibizione optogenetica dell'attività nervosa è mediata dall'attivazione di determinate proteine trans-membrana, sensibili a specifiche lunghezze d'onda: a) Eccitazione optogenetica: la luce blu ($\lambda=470\text{ nm}$) attiva la Canalrodopsina-2, opsina selettiva per ioni positivi; b) Inibizione optogenetica: la luce gialla ($\lambda=589\text{ nm}$) attiva l'Alorodopsina, opsina selettiva per ioni negativi; c) L'eccitazione e l'inibizione optogenetiche garantiscono maggior specificità e selettività nella modulazione dell'attività elettrica cellulare, rispetto alla stimolazione mediante elettrodi.

L'obiettivo dell'optogenetica consiste nel realizzare un metodo mediante il quale tutti i neuroni di un unico tipo possono essere attivati o inattivati, lasciando gli altri inalterati. L'aspetto che entusiasma i neuroscienziati è il controllo su eventi definiti, in tipi cellulari definiti e in istanti definiti, con un livello di precisione e una risoluzione analitica elevati. Tramite dei vettori virali, uno strumento utilizzato per rilasciare materiale genetico, si può integrare nel DNA delle cellule bersaglio il gene che codifica per l'opsina. Questa integrazione, progettata per essere efficiente solo sul tipo cellulare designato, porta all'espressione della proteina sulla membrana del neurone: una vicina fonte di luce, settata sulle giuste lunghezze d'onda e frequenza, potrà allora interagire con questa, attivando o inibendo il neurone.

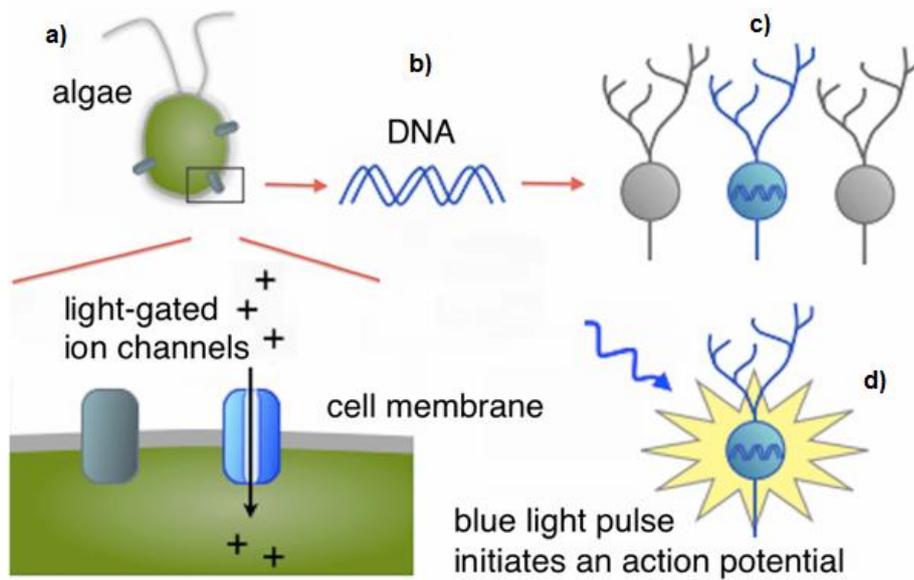


Figura 40 - Il principio di funzionamento dell'optogenetica: a) Proteina sensibile alla luce proveniente da un'alga. Tale proteina è un canale ionico che si apre in risposta alla luce blu; b) Materiale genetico contenente il gene che codifica per l'opsina specifica; c) Inserimento del DNA nel neurone target; d) La somministrazione di un impulso di luce blu causa l'attivazione del neurone, generando un potenziale d'azione.

Nel caso di degenerazione fotorecettoriale della retina, il transfert genetico di proteine fotosensibili utilizza un virus adeno-associato (AAV) che va ad infettare i coni non attivi, che hanno perso il segmento esterno. Essi sono accessibili perché rimangono nell'organismo anche quando hanno smesso di funzionare, mantenendo alcune proprietà elettriche e legami con i neuroni retinici che trasmettono informazioni visive al cervello. Il metodo è stato sperimentato sui topi, dimostrando che l'innestamento di alorodopsina archeobatterica nei coni ha reso gli animali di nuovo in grado di percepire gli input luminosi. Pertanto, i fotorecettori che hanno perso la propria funzionalità a causa della degenerazione, possono essere programmati geneticamente per rispondere alla luce, riacquistando fotosensibilità.

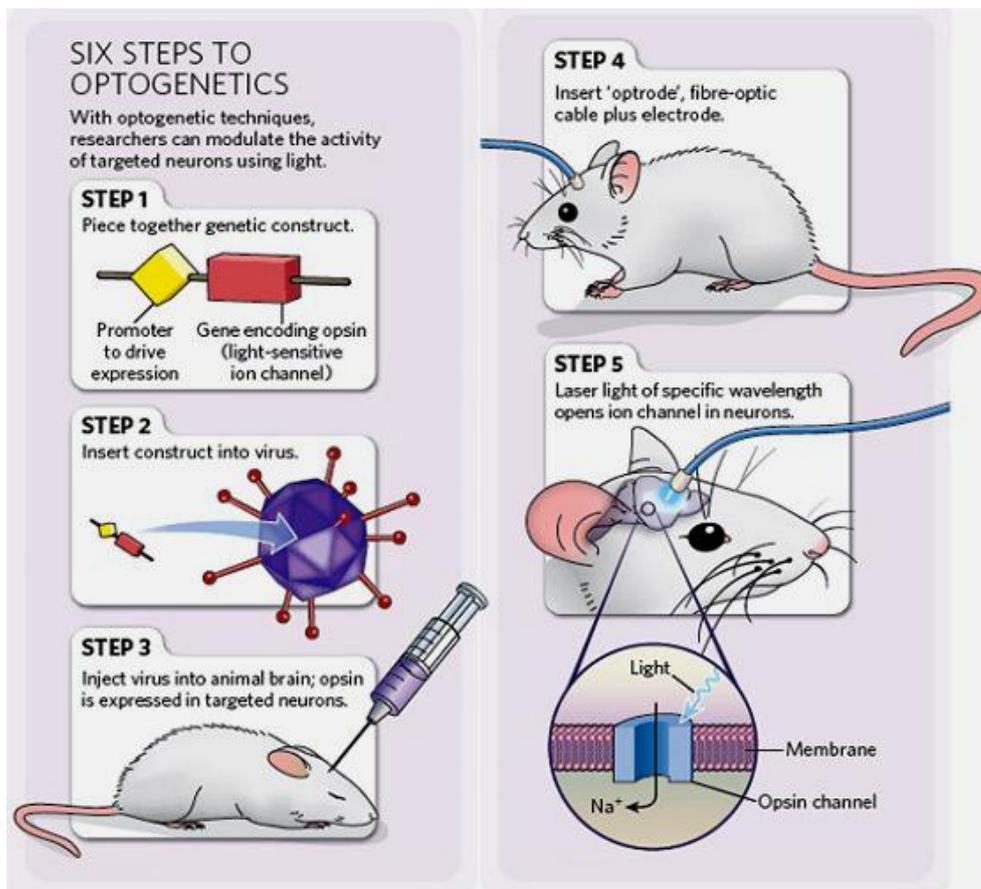


Figura 41 -La procedura applicativa della tecnologia optogenetica: nello **STEP 1** viene creato un costrutto genetico, formato da un gene che codifica per l'opsina e da un promotore che guida l'espressione genetica solo in un tipo cellulare specifico. Nello **STEP 2**, il costrutto viene inserito in un virus, che, nello **STEP 3**, verrà iniettato nel cervello dell'animale. Il virus infetterà molte cellule nervose, ma a causa della presenza del promotore, l'espressione dell'opsina avverrà solo nel neurone target. Lo **STEP 4** prevede l'applicazione di un sistema ibrido integrato fibra ottica-elettrodo, chiamato "optrodo", sul cranio dell'animale. Le fibre ottiche inserite come sonde nel cervello emettono lampi che controllano pattern specifici di attività neurale. Più profondamente viene impiantata la fibra ottica, maggiore quantità di luce arriva in aree più profonde del cervello. Lo **STEP 5** è dato dall'apertura dei canali ionici neuronali, in risposta a stimoli luminosi di specifica lunghezza d'onda. L'ingresso di ioni determina, nell'ultimo step, la variazione del potenziale di membrana, con conseguente attivazione o inibizione del neurone.

I vantaggi della tecnologia optogenetica risiedono nell'abilità di sondare e pilotare i processi cellulari mediante la luce, con precisione al millisecondo, selettività ed elevata risoluzione spaziale e temporale. Strumento emergente

nell'area delle neuroscienze, l'optogenetica ha compiuto enormi progressi negli ultimi tempi. Pazienti affetti da disturbi neurologici e psichiatrici possono trarre beneficio da intuizioni che sorgono nel corso della ricerca optogenetica, la quale ha fornito preziose informazioni per la comprensione dei meccanismi di sviluppo di patologie come la malattia di Parkinson, l'autismo, la schizofrenia, la depressione, i disturbi del sonno e le tossicodipendenze. Inoltre negli ultimi anni sta crescendo il ruolo dell'optogenetica associata ad altre tecnologie, come la tecnica di scansione cerebrale della risonanza magnetica funzionale (fMRI). Tale accoppiamento può stabilire la mappa funzionale dei circuiti neurali con maggiore completezza [39], [45], [46].

Data la capacità di modulare otticamente l'attività di cellule fotosensibili geneticamente programmate, la tecnologia optogenetica si presenta come una promettente via d'indagine per la realizzazione di terapie finalizzate alla riabilitazione della funzionalità retinica, nei casi di retinopatia degenerativa. Tuttavia, questioni legate alla sicurezza, alla legislazione e alla bioetica nell'ambito della manipolazione genetica, limitano l'applicabilità della terapia optogenetica nella sperimentazione su umani.

Richiedendo modificazioni per via genetica, l'optogenetica su umani potrebbe essere equiparata ad una terapia genica e deve pertanto fare riferimento a "Linee guida per la sicurezza della sperimentazione in terapia genetica", documento elaborato nel 1996 dal Comitato Nazionale per la Biosicurezza e le Biotecnologie, sul tema della terapia genica. Per "Terapia Genica" (TG) si intendono quegli interventi medici che comportano modificazioni deliberate del materiale genetico di cellule viventi allo scopo di prevenire, curare o diagnosticare situazioni patologiche nell'uomo. Le cellule possono essere modificate in vivo attraverso prodotti somministrati direttamente al soggetto, oppure ex vivo attraverso manipolazioni e processi che ne modificano le caratteristiche genetiche prima della somministrazione. Il documento ha lo scopo di fornire una guida alle procedure e agli aspetti regolatori, da seguire ogni volta che si intenda condurre una Terapia Genica volta a modificare il patrimonio genetico somatico in un soggetto umano.

L'utilizzo di prodotti per TG è regolamentato da normative nazionali ed internazionali, riferite a due campi: il controllo ambientale rispetto al rischio derivante dall'uso di microrganismi geneticamente modificati (MOGM) ed altri agenti biologici, e l'ambito delle disposizioni che regolano la produzione, l'utilizzo e la commercializzazione dei Prodotti Medicinali.

Direttiva 2009/41/CE	Impiego confinato di microrganismi geneticamente modificati
Regolamento (CE) n. 1394/2007 del Parlamento europeo e del Consiglio, sui medicinali per terapie avanzate e recante modifica della Direttiva 2001/83/CE e del Regolamento (CE) n. 726/2004	Il presente regolamento fissa norme per i medicinali per terapie avanzate, preparati industrialmente o nella cui fabbricazione intervenga un processo industriale, e destinati al commercio negli Stati membri
Direttiva 2001/18/CE	Rilascio deliberato di organismi geneticamente modificati nell'ambiente
Decreto legislativo 81/2008 Decreto legislativo 106/2009 disposizioni integrative e correttive al Decreto legislativo 81/2008	Testo Unico sulla salute e sicurezza nei luoghi di lavoro
Decreto legislativo 116/92 recepimento della Direttiva 86/609/CE	Sulla protezione degli animali utilizzati a fini sperimentali o ad altri fini scientifici

Tabella 1 - Normativa di riferimento per la Terapia Genica.

Gli aspetti regolatori della Terapia Genica coprono i campi della ricerca sperimentale, degli studi preclinici, inclusi quelli sugli animali, della preparazione e produzione di prodotti per Terapia Genica, della sperimentazione e dello sviluppo clinico. Al momento di avviare una ricerca

sperimentale per Terapia Genica deve essere effettuata una valutazione dei rischi derivanti dagli agenti biologici impiegati e dalle possibili sorgenti di contaminazione, della sicurezza riguardante le procedure utilizzate, dei vantaggi rispetto a sistemi terapeutici alternativi ed in relazione ai benefici attesi. È necessario considerare i dati di sicurezza ed efficacia ottenuti nelle esperienze ex vivo e nei test preclinici, con accertamento di potenziale ricombinazione dei virus in vivo e valutazione degli effetti tossicologici e dei problemi immunologici. La preparazione e la produzione di prodotti di TG destinati all'uomo devono seguire "Linee guida per l'applicazione delle GMP (Good Manufacturing Practise) durante la preparazione di prodotti per la Terapia Genica in fase di sperimentazione clinica", per la validazione del prodotto dal punto di vista della sicurezza e della qualità. Successivamente deve essere fatta una valutazione del trattamento vero e proprio, con particolare riferimento ai rischi riguardanti il paziente che riceve il transgene. Sono da considerare le modalità di trasferimento e trasmissione del gene, assicurandosi che si ottenga unicamente l'espressione del gene desiderato e che l'inserzione non modifichi altri geni provocando l'espressione in cellule diverse da quelle bersaglio.

È richiesta l'analisi di possibili effetti patogeni del trasferimento genetico e dei rischi che l'impiego dei vettori virali può produrre sul paziente, su terzi e sull'ambiente, adattando misure di precauzione adeguate. La sperimentazione clinica è regolamentata da leggi nazionali ed internazionali. In particolare occorre fare riferimento alle "Good Clinical Practices" CPMP/ICH/135/95, recepite con D.M. 15 Luglio 1997, e alla Circolare n. 8, 10 Luglio 1997, del Ministero della Sanità. Per l'esposizione sull'uomo di prodotti per terapia genica deve essere data giustificazione della sperimentazione e della sua validità scientifica, devono essere specificati gli obiettivi della ricerca e gli indicatori di attività della malattia disponibili per valutare il successo della terapia genica proposta, devono essere indicati i benefici previsti in merito alla guarigione della patologia o ad un miglioramento delle condizioni cliniche del paziente e della sua qualità di vita. Deve essere fornita una descrizione del costrutto genetico e delle

modalità di ottenimento del prodotto geneticamente modificato e dimostrate la stabilità, l'integrità, la tollerabilità e l'efficacia del materiale genetico presente nella preparazione finale.

La sicurezza delle attività che comportano l'utilizzo di materiale geneticamente modificato deve essere garantita al fine di tutelare la salute umana e ambientale. Data la preoccupazione emersa nel corso degli anni rispetto ai potenziali rischi che l'utilizzo delle biotecnologie può comportare per l'uomo e per l'ambiente, il riferimento alle Direttive Europee riguardanti gli aspetti regolatori e le norme procedurali della Terapia Genica stabilisce una guida da ottemperare per chiunque intenda manipolare, produrre, utilizzare o rilasciare nell'ambiente esterno microrganismi o organismi geneticamente modificati.

La Terapia Genica, infine, pone problemi etici a livello individuale e sociale. La praticabilità della Terapia Genica è da ammettersi in quanto essa, non discostandosi per aspetti essenziali da altre forme di intervento terapeutico, può essere ricondotta al medesimo principio di diritto alla salute che legittima il complesso di tali attività sanitarie. La Terapia Genica, indispensabile a sottrarre il paziente alla morte, deve sottostare ai criteri generali di ogni prestazione medica, fondata su presupposti scientifici accettati, e può essere effettuata in assenza di terapie alternative più efficaci e con il consenso informato del paziente.

In accordo con quanto riconosciuto e stabilito da tutti gli organismi internazionali ed europei, la terapia genica della linea germinale, capace cioè di influenzare la trasmissione del patrimonio genetico alle generazioni successive, non è ammissibile nell'uomo. Di converso, la terapia di cellule della linea somatica, che interessa le cellule somatiche di un solo individuo, è accettabile in presenza di adatte condizioni e nel rispetto dei requisiti di natura tecnico-scientifica e di ordine etico e giuridico [48].

Sebbene la linea di confine fra un'intrusione accettabile ed un'interferenza pericolosa nel cervello sia difficile da indicare, il potenziale danno derivante dall'interferire della tecnologia optogenetica con il sistema nervoso umano ne mette in discussione la sperimentazione su umani. Comparata alle terapie

geniche tradizionali, in cui l'obiettivo è rimpiazzare un gene umano difettoso, l'optogenetica va ad inserire un gene non umano nel cervello umano e questo potrebbe comportare effetti avversi nell'organismo, come risposte immunitarie indesiderate. Pertanto si parla di forma complessa di intervento genico. L'optogenetica si aggiunge inoltre al gruppo di quelle tecnologie di modulazione cerebrale la cui efficacia è tale da sollevare questioni bioetiche.

Un altro argomento di discussione è il fatto che, in molti casi di malattie psichiatriche e neurologiche, non si conoscono completamente i fondamenti biologici tanto da eseguire interventi razionali. Anche potendo controllare una parte del cervello umano, non si sarebbe in grado di conoscere quali specifici impulsi attivano le aree cerebrali coinvolte.

Pertanto l'optogenetica può probabilmente assumere un ruolo più prominente nella ricerca di base, per individuare le funzioni del cervello e per indagare nuove terapie basate sulle conoscenze già in possesso, che nella sperimentazione a scopi terapeutici sugli esseri umani.

IV. 2 SEMICONDUTTORI ORGANICI FOTOSENSIBILI

Nell'ultimo decennio, molti sforzi sono stati dedicati al perfezionamento dell'interfaccia fra la componente elettronica e il substrato biologico ed attualmente l'utilizzo di semiconduttori organici fornisce nuove possibilità per lo sviluppo di tecnologie biomimetiche che meglio riproducono le caratteristiche del sistema umano. I semiconduttori inorganici, come il silicio, sono alla base della maggior parte dei dispositivi elettronici oggi in uso: essi sono caratterizzati da un'elevata efficienza e da una buona stabilità nel tempo. D'altra parte, i semiconduttori organici mostrano specifici vantaggi in termini di flessibilità, biocompatibilità ed eccitabilità in risposta a stimoli luminosi e possiedono grandi potenzialità per applicazioni di fotostimolazione in vivo e sistemi artificiali visivi, come le protesi retinali.

I semiconduttori organici sono formati da singoli cristalli, piccole molecole e polimeri coniugati, i quali sono basati sulla congiunzione di atomi di carbonio, assemblati a formare molecole molto simili alle strutture naturali, in particolare alle molecole della retina, presentando pertanto una più intensa affinità con il sistema biologico. I polimeri coniugati (CPs) sono polimeri intrinsecamente conduttori, costituiti da molecole con legami coniugati, che, grazie alla loro struttura, possono essere classificabili come semiconduttori. L'alternanza di legami doppi e singoli lungo lo scheletro del polimero coniugato rende infatti questo materiale elettricamente conduttivo. La presenza di legami deboli π delocalizzati induce una forte reattività alla luce e conferisce ai CPs proprietà fotosensibili. A temperatura ambiente, la conducibilità del polimero non raggiunge un livello utile, pertanto è necessario drogare il materiale addizionandolo con sostanze elettron-accettrici che ne aumentano il numero di lacune. Le unità base della catena polimerica, i monomeri, possono organizzarsi in configurazioni differenti, conferendo flessibilità al materiale.

L'assorbimento di fotoni in un CPs genera un legame elettrone-lacuna, che dà luogo ad un'interazione colombiana formando una coppia legata, chiamata eccitone. Per dare origine a una fotocorrente, gli eccitoni necessitano di essere convertiti in portatori liberi di carica. L'efficienza di dissociazione dell'eccitone può essere ottenuta miscelando il polimero coniugato, che agisce da donatore di elettroni, con un accettore di elettroni, tipicamente appartenente al gruppo dei fullereni. La combinazione di un elettrone-donatore (p-doped) e di un elettrone-accettore (n-doped) è denominata eterogiunzione bulk (BHJ, bulk heterojunction) ed è alla base delle celle fotovoltaiche organiche. Una cella fotovoltaica organica è un dispositivo che utilizza materiali organici nello strato attivo e converte la luce assorbita in elettricità grazie all'effetto fotovoltaico, fenomeno per cui si ha la generazione di una forza elettromotrice in un mezzo investito da radiazioni elettromagnetiche.

Interfacciare un dispositivo fotovoltaico organico al tessuto biologico pone delle costrizioni in termini di degradazione, in particolare per quanto

concerne gli elettrodi. Un possibile rimedio consiste nel sostituire il contatto elettronico con una soluzione elettrolitica. La differenza fra questo tipo di configurazione, detta ibrida, e la convenzionale interfaccia a stato solido è legata ai fenomeni di interazione fra il polimero e la soluzione elettrolitica. Nel dispositivo ibrido la conduzione combina caratteristiche elettroniche e ioniche, in contrasto con la conduzione puramente elettronica del sistema a stato solido.

I polimeri coniugati combinano le proprietà meccaniche e la semplicità dei processi tecnologici tipiche della plastica con le proprietà optoelettroniche dei semiconduttori e, per la flessibilità e il basso grado di tossicità, rappresentano un eccellente materiale biocompatibile per applicazioni biologiche, permettendo un'interfaccia più intima con l'ambiente fisiologico. Sono in grado di condurre sia elettroni, sia ioni, e formano una stabile interfaccia con l'acqua, aprendo un nuovo canale di comunicazione fra l'elettronica e la biologia [40], [41].

IV.2.1 La modulazione del potenziale di membrana mediante l'utilizzo di polimeri fotosensibili

Nel 2011 Ghezzi e colleghi furono i primi a dimostrare il principio di modulazione dell'attività neuronale indotta dalla fotostimolazione, per mezzo di polimeri organici sensibili alla luce. Il progetto del dispositivo fotovoltaico organico utilizza una miscela di due polimeri: il P3HT (poli-3-esiltiofene), che, nella etero giunzione bulk, agisce come donatore di elettroni, ed il PCMB (estere metilico dell'acido fenil-C₆₁.butirrico), che si comporta come accettore di elettroni.

Il processo di realizzazione del dispositivo è relativamente semplice ed economico e prevede una serie di stadi. La deposizione del layer polimerico avviene mediante tecniche di rivestimento, come la deposizione per rotazione (*spin-coating*), una procedura in cui una quantità di polimero diluita viene depositata sul substrato, che viene successivamente messo in rapida rotazione tramite un apposito rivestitore rotante, al fine di spargere il fluido sul substrato per effetto della forza centrifuga.

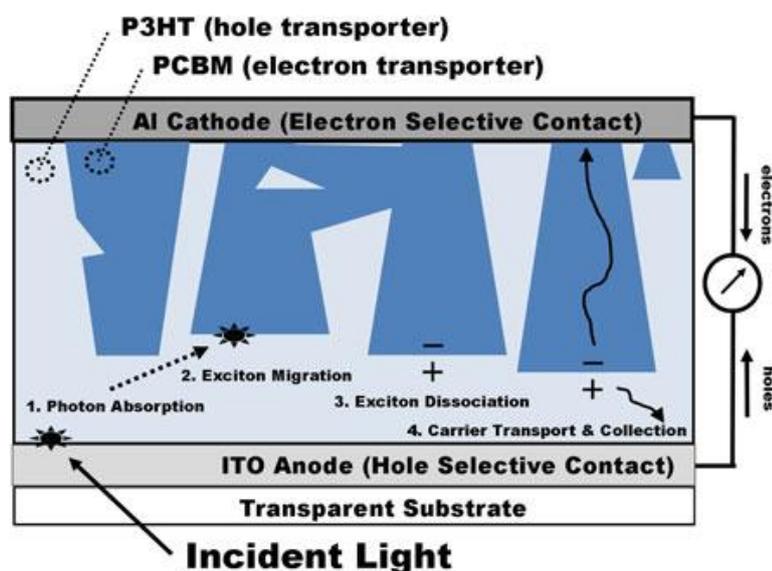


Figura 42 - Configurazione standard di una cella fotovoltaica organica a eterogiunzione bulk. La miscela dell'elettron-donatore (P3HT) e dell'elettron-accettore (PCBM) è posizionata fra uno strato di ossido Indio-Stagno (ITO), che rappresenta l'anodo, e uno strato di ossido di Alluminio (Al), che rappresenta il catodo del dispositivo. La fotoeccitazione avviene in quattro step: 1) Dopo aver attraversato l'anodo trasparente, il fotone incidente viene assorbito dal P3HT, causando la generazione di un eccitone. 2) L'eccitone migra verso l'interfaccia dell'eterogiunzione bulk. 3) Qui, l'eccitone si dissocia, grazie al trasferimento di carica interfacciale, in una coppia di portatori liberi di carica, cioè una lacuna nel polimero P3HT e un elettrone nel fullerene PCBM. 4) I portatori migrano verso l'elettrodo, trasferendo la carica al circuito esterno.

Il film polimerico attivo è rivestito da un substrato vetroso il quale è pre-ricoperto con ossido di Indio e Stagno (ITO, Indium-Tin Oxide) che costituisce l'anodo del fotorivelatore. Successivamente la miscela organica viene riscaldata a 120°C per 2 h. Il trattamento termico ha il duplice scopo di migliorare la morfologia del film polimerico, ottimizzando l'efficienza della fotogenerazione della carica, e preparare il film per le successive colture cellulari, rimuovendo ogni traccia di solventi organici e sterilizzando il substrato. Lo strato polimerico viene rivestito da PLL (poli-L-lisina), per favorire una migliore adesione delle cellule che vi saranno fatte crescere. Specifici requisiti devono essere rispettati da un dispositivo fotovoltaico organico. I semiconduttori organici devono resistere alla procedura di sterilizzazione e preservare le proprie caratteristiche una volta immersi in un

mezzo di coltura, devono essere assicurate la crescita e la sopravvivenza delle cellule coltivate sullo strato polimerico e mantenute le funzionalità della rete nervosa.

In una prima fase di studio, è stato osservato che le proprietà fotosensibili del dispositivo non vengono alterate dalla sterilizzazione termica, né dalla colata di poli-L-lisina. Il sistema, completamente immerso in una soluzione elettrolitica (tipicamente una soluzione acquosa di NaCl, che è il componente più abbondante nei fluidi extracellulari biologici), conserva la propria capacità di fotoconversione per oltre 28 giorni, provando stabilità nel tempo ed equilibrio elettrico all'interfaccia polimero-elettrolita. L'effetto di un'illuminazione continua per 28 h sull'efficienza di fotoconversione dimostra che, dopo un decremento transitorio all'inizio della stimolazione, la fotocorrente rimane costante nel tempo.

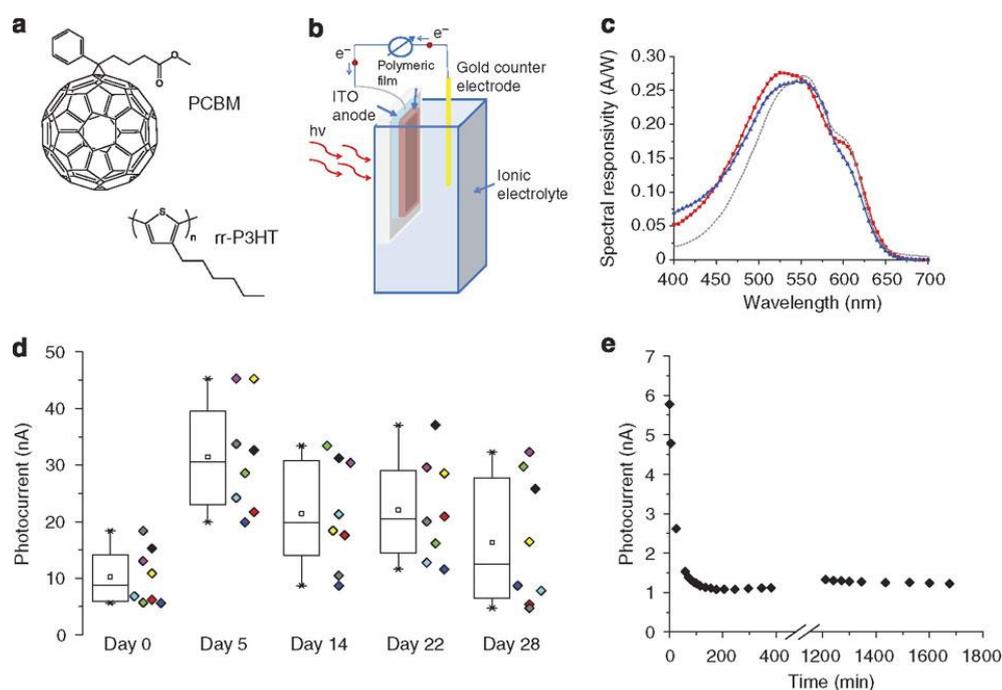


Figura 43- a) Struttura chimica del PCBM e del P3HT regio-regolare; b) Schema di una cella ibrida solido-liquida per la modulazione della fotocorrente; c) Risposta spettrale dei sistemi ITO/P3HT:PCBM/NaCl/Gold (linea blu) e ITO/P3HT:PCBM/Ringer/Gold (linea rossa), con la soluzione salina che lavora come catodo, registrata dopo 12 giorni di immersione nel mezzo. La risposta spettrale tipica di una cella a stato solido (ITO/P3HT:PCBM/Al) è riportata come riferimento (linea grigio). Non si

notano differenze significative e le caratteristiche spettroscopiche sono ben riprodotte; d) La fotocorrente massima (a 530 nm) è registrata in otto distinti dispositivi (contraddistinti da otto diversi colori), immediatamente dopo la fabbricazione (day 0) e dopo 28 giorni. I campioni sono tenuti completamente immersi nella soluzione elettrolitica per tutto il periodo; e) Stabilità della fotocorrente del sistema ITO/P3HT:PCBM/NaCl/Gold in condizioni di illuminazione continua. Il grafico mostra la fotocorrente registrata a 530 nm in vari momenti fino a 28h.

In una seconda fase di sperimentazione, cellule primarie di ippocampo di ratto, fatte crescere in coltura sulla superficie del P3HT:PCBM per alcune settimane, hanno provato la biocompatibilità dell'interfaccia biorganica. I pattern di crescita, l'adesione neuronale, la vitalità e la mortalità cellulare non hanno rivelato differenze significative fra la sperimentazione per 28 DIV (days in vitro) della coltura sul dispositivo ITO/ P3HT:PCBM, trattato con PLL, e sul substrato vetroso di controllo, rivestito con ITO e PLL.

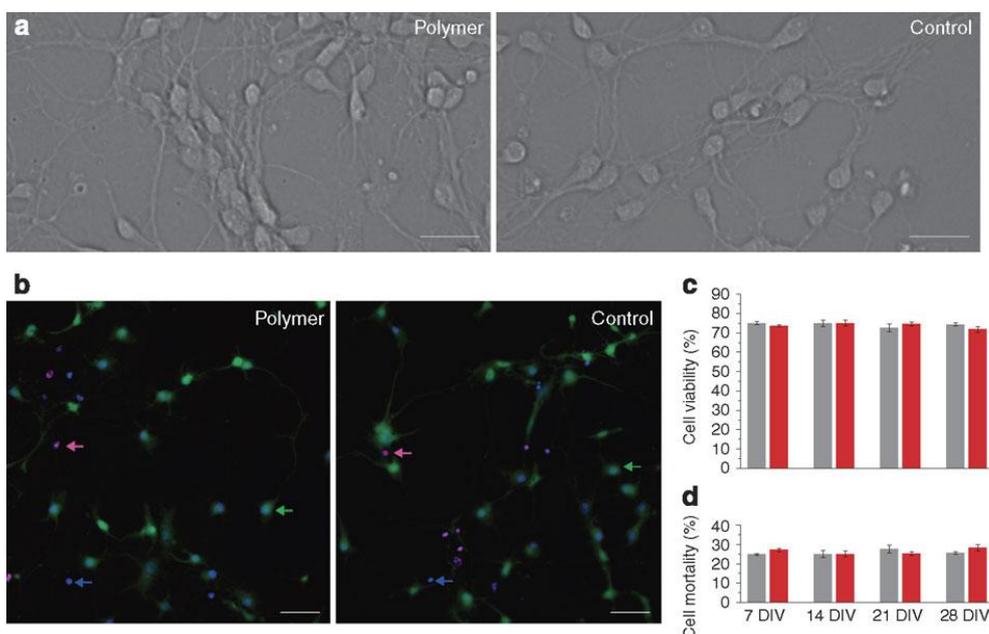


Figura 44 - Vitalità e mortalità cellulare di un'interfaccia biorganica attiva. a) Coltura di neuroni di ippocampo su un dispositivo ITO/P3HT:PCBM, trattato con PLL (a sinistra), e su un substrato vetroso di controllo, rivestito con ITO e PLL (a destra), dopo 12 DIV; b) Test della vitalità con propidio ioduro/fluoresceina diacetato, effettuato dopo 21 DIV. Le frecce verdi, blu e viola indicano rispettivamente le cellule vitali, le cellule apoptotiche e le cellule apoptotiche/necrotiche; c) Analisi statistica della vitalità cellulare nel substrato di controllo (grigio) o nel substrato polimerico (rosso), in quattro momenti temporali: 7 DIV, 14 DIV, 21 DIV e

28 DIV; d) *Analisi statistica della mortalità cellulare nelle stesse condizioni.*

L'esame elettro-fisiologico dell'attività dei neuroni in coltura viene attuato per mezzo di tecniche di patch-clamp. Per dimostrare che il dispositivo fotovoltaico è in grado di manipolare l'attività nervosa, la misurazione dei potenziali d'azione dei neuroni in coltura è stata effettuata sottoponendo le cellule a impulsi di luce spazialmente delimitati.

L'applicazione di un segnale luminoso di durata 50 ms produce un potenziale d'azione. Usando un treno di impulsi di 20 ms, si ha la generazione di sequenze di spike nervosi, con solo una piccola percentuale di errore.

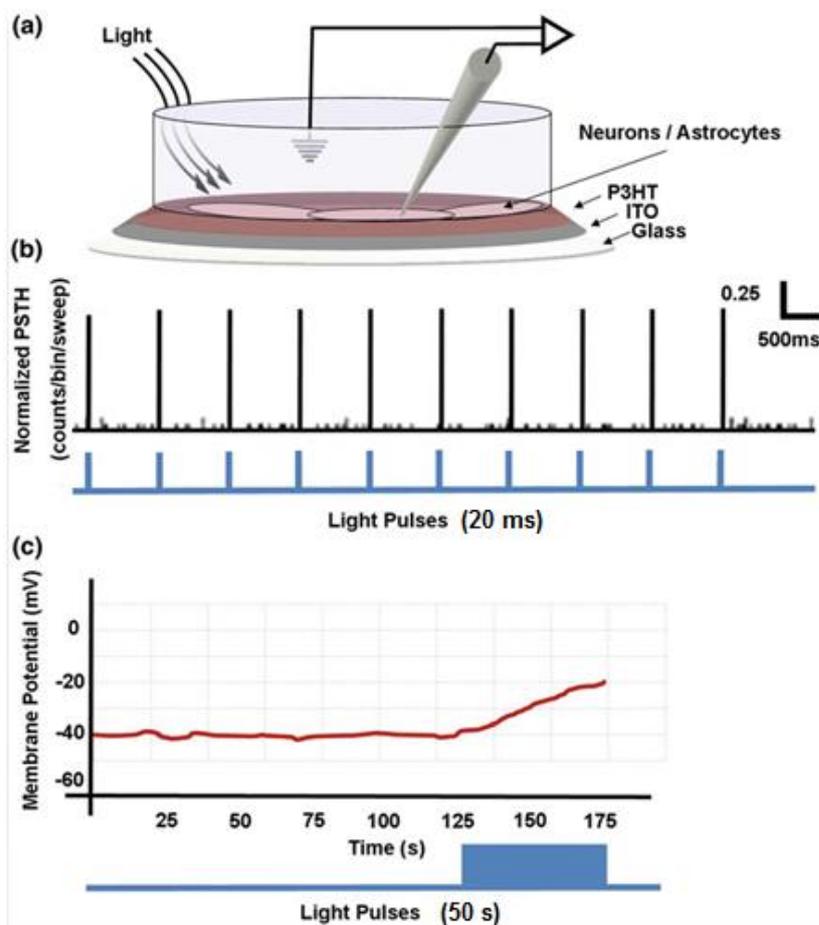


Figura 45 - Il potenziale di membrana delle cellule in coltura sullo strato polimerico P3HT:PCBM può essere modulato usando stimoli luminosi: a) Configurazione sperimentale per la misurazione, mediante patch-clamp, del potenziale di membrana delle cellule in coltura sul dispositivo fotovoltaico organico (OPV); b) I potenziali d'azione dei neuroni possono essere

generati con l'applicazione di brevi impulsi di luce (20 ms); c) Gli astrociti, stimolati con lunghi impulsi di luce (50 s), rispondono con un incremento della depolarizzazione del potenziale di membrana.

Esiste una stretta relazione fra la locazione dello stimolo relativa al corpo cellulare e la generazione del potenziale d'azione. Solo quando lo stimolo colpisce direttamente il soma del neurone ha origine il potenziale d'azione, mentre questo non risulta efficace se il segnale è disperso in altre direzioni. L'attività nervosa sulla superficie di un polimero fotosensibile può essere controllata con successo e l'effetto fotovoltaico viene altamente localizzato sul sito di illuminazione. È possibile stimolare gli astrociti della neocorteccia usando la stessa miscela polimerica, la cui fotoeccitazione produce un'ampia depolarizzazione del potenziale di membrana astrogliale. I risultati ottenuti confermano che è possibile ottenere la conversione degli impulsi di luce in attività elettrica neuronale per mezzo di interfacce polimeriche biorganiche, capaci di modulare otticamente il potenziale di membrana di neuroni ed astrociti e compatibili con la vita della coltura cellulare [39], [40], [41], [42].

IV.2.2 L'applicazione di dispositivi fotovoltaici organici nelle degenerazioni retiniche

Data la capacità dei polimeri coniugati di modulare l'attività neurale in seguito a fotostimolazione e le proprietà di biocompatibilità e flessibilità dello strato polimerico, l'impiego dei semiconduttori organici può essere rafforzato ed esteso al campo della visione artificiale, trovando applicazione, come materiali attivi, nelle protesi retinali per la riabilitazione visiva in condizioni di distrofia retinica. Per valutare la validità di tale approccio, Ghezzi e collaboratori hanno indagato la possibilità di recuperare la sensibilità di un modello di retina animale, affetta da degenerazione fotorecettoriale indotta, interfacciandola ad un film organico di P3HT. A tal fine, è stata registrata l'attività delle cellule gangliari nella retina espiantata, ponendosi in una configurazione subretinale, con lo strato dei fotorecettori degenerati in contatto con il polimero.

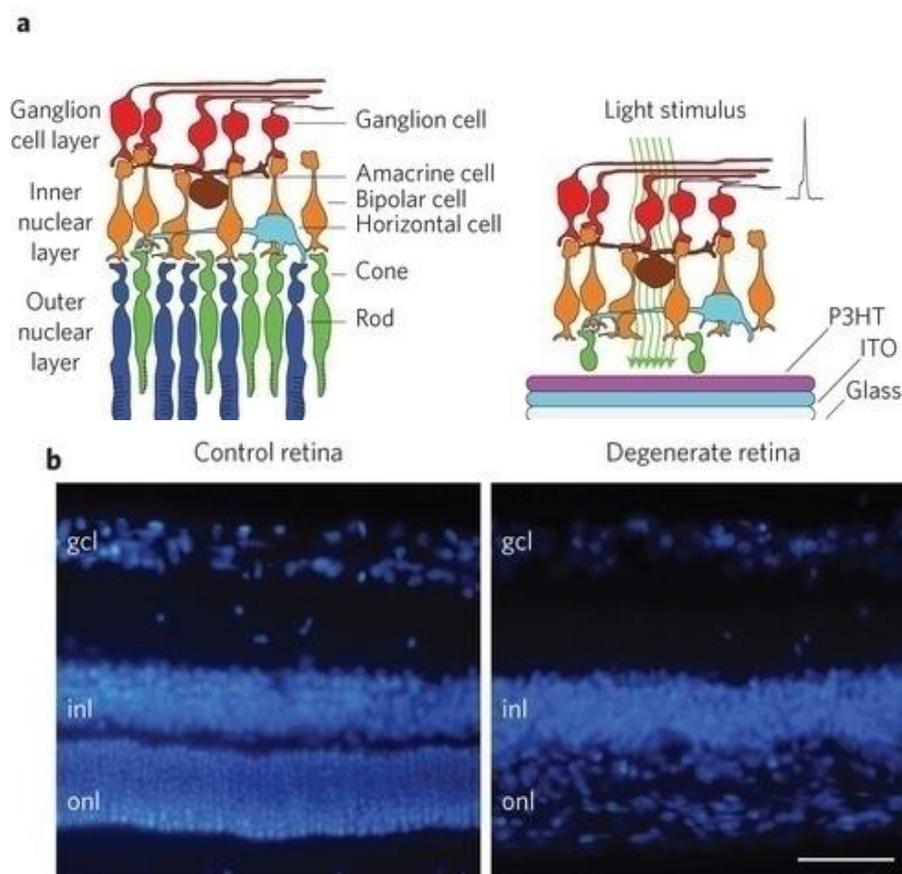


Figura 46 - Lo strato dei fotorecettori è riprodotto dallo strato polimerico organico nella retina degenerata. a) Illustrazione della struttura retinica (a sinistra), interfaccia e meccanismo di fotostimolazione per la retina degenerata (a destra); b) Immagini confocali delle sezioni latero-dorsali della retina di controllo (a sinistra) e della retina degenerata (a destra), (gcl, ganglion cell layer; inl, inner nuclear layer; onl, outer nuclear layer).

La risposta di output della retina alla luce è stata studiata esaminando il comportamento elettrico delle cellule gangliari in due condizioni: il tessuto retinico degenerato viene posizionato su di un substrato vetroso ricoperto dallo strato P3HT:ITO oppure su di un substrato vetroso rivestito dal solo strato ITO. È emerso che lo stimolo luminoso fallisce nella generazione di spike nel caso in cui le cellule retiniche siano poste sul film glass:ITO, mentre produce un'intensa attività elettrica nella retina di controllo, attività che viene riprodotta nella configurazione glass: ITO P3HT.

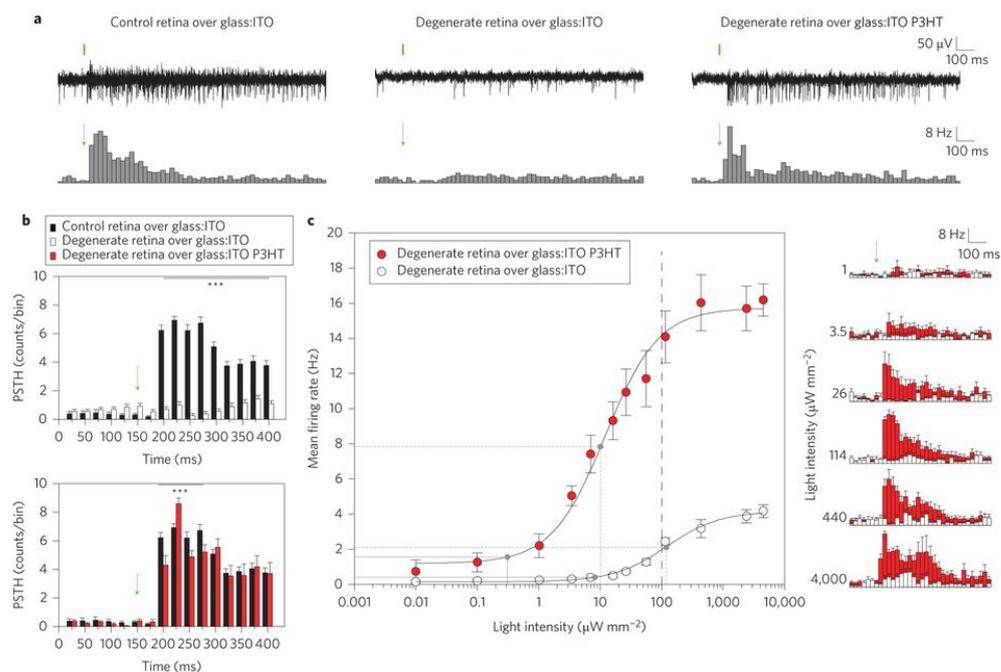


Figura 47 - Il film polimerico P3HT può restituire alla retina degenerata responsività alla luce: a) Registrazione extracellulare dell'attività elettrica gangliare fotoindotta e risultanti PSTH (post-stimulus time histograms) normalizzati da: retina sana di controllo posta su di un substrato glass:ITO (a sinistra), retina degenerata su glass:ITO (al centro) e retina degenerata su glass:ITO:P3HT; b) Comparazione dei PSTH medi; c) Relazione fra la frequenza di scarica media delle cellule gangliari e l'intensità dello stimolo luminoso, in retina degenerata su glass:ITO:P3HT e in retina degenerata su glass:ITO. A destra: rappresentazione dei PSTH ottenuti in presenza (rosso) o in assenza (grigio) di P3HT. La freccia verde indica lo stimolo luminoso.

I risultati conseguiti dimostrano che, in condizioni di distrofia retinica, l'interfaccia polimerica organica è in grado di ripristinare la fotosensibilità della retina e di riprodurre il ruolo dei fotorecettori nella trasduzione della luce in segnale nervoso e nell'attivazione elettrica della neuroretina interna vitale, generando la scarica di potenziali d'azione nel circuito gangliare e suscitando l'evocazione di potenziali visivi in corteccia, a livelli indistinguibili rispetto a quelli registrati in condizioni fisiologiche. La prova che un polimero organico agisce come uno strato fotorecettoriale artificiale in una retina espianata indica la via per lo sviluppo di una "next generation" di dispositivi protesici organici fotovoltaici per impianti subretinali, con sensibilità all'irradianza compatibile con i range fisiologici di illuminazione.

Il ripristino della sensibilità alla luce rappresenta l'obiettivo e la sfida principale degli approcci finora proposti per la riabilitazione della funzionalità retinica. Molte applicazioni non raggiungono livelli di fotosensibilità sufficienti per la percezione dell'irradiazione diurna, richiedendo proiettori di luce esterni, e devono tenere in considerazione i valori di massima esposizione alle radiazioni elettromagnetiche permessi dagli standard di sicurezza oculare, in applicazioni oftalmiche. Il dispositivo fotovoltaico organico realizzato dimostra di avere una notevole sensibilità alla luce, con una soglia di stimolazione pari a $0.3 \mu\text{W mm}^{-2}$, 30 volte minore dei limiti di sicurezza oculare per l'esposizione continua alla luce visibile ($106.93 \mu\text{W mm}^{-2}$), e con risposta di saturazione pari a $100 \mu\text{W mm}^{-2}$, ancora inferiore ai limiti consentiti. La soglia percettiva si avvicina al range ($0.1-10 \mu\text{W mm}^{-2}$) di irradianza retinale durante una comune attività diurna svolta in ambiente aperto, suggerendo possibili implementazioni future, senza il ricorso a proiettori di luce esterni. Un'altra caratteristica rilevante dell'interfaccia fotovoltaica è legata al range dinamico lineare di operazione, che dura due unità logaritmiche dell'irradianza retinica ($1-100 \mu\text{W mm}^{-2}$). Tale range lineare di operazione consente la modulazione del segnale di output retinico in base alla quantità di luce che raggiunge l'interfaccia polimero-retina. Risulta che il picco dell'attività gangliare può essere sintonizzato fra 1 e 30 Hz. La possibilità di modulare direttamente l'output della retina in base alla quantità di luce è un requisito estremamente importante nello sviluppo di protesi artificiali finalizzate al recupero della sensibilità retinica. Nonostante i risultati promettenti, sono necessari alcuni miglioramenti per ripristinare la funzionalità fisiologica della retina. Il range dinamico lineare osservato del dispositivo organico ($1-100 \mu\text{W mm}^{-2}$) copre parzialmente il range di irradianza diurna retinica ($0.1-10 \mu\text{W mm}^{-2}$) ed è richiesto un incremento della capacità di fotoassorbimento o dell'efficienza della stimolazione. Il guadagno lineare dell'attività gangliare è minore rispetto al tipico guadagno del segnale di output che descrive l'attività delle cellule gangliari in condizioni fisiologiche. Possibili strategie per migliorare la performance della bio-interfaccia organica comprendono: la riduzione

dello spessore del film attivo polimerico e l'incremento della flessibilità del semiconduttore per garantire un maggior assorbimento di fotoni ed un maggior movimento di portatori di carica, la progettazione di un'architettura multi-strato per estendere la sensibilità spettrale del dispositivo, la fabbricazione chimico-ingegneristica di capsule per proteggere il polimero dalla degradazione dovuta all'esposizione, a lungo termine, ai mezzi extracellulari acquosi.

Uno dei vantaggi che viene attribuito all'interfaccia fotovoltaica organica facendone una potenziale applicazione in vivo, è legato all'elevata risoluzione spaziale e temporale.

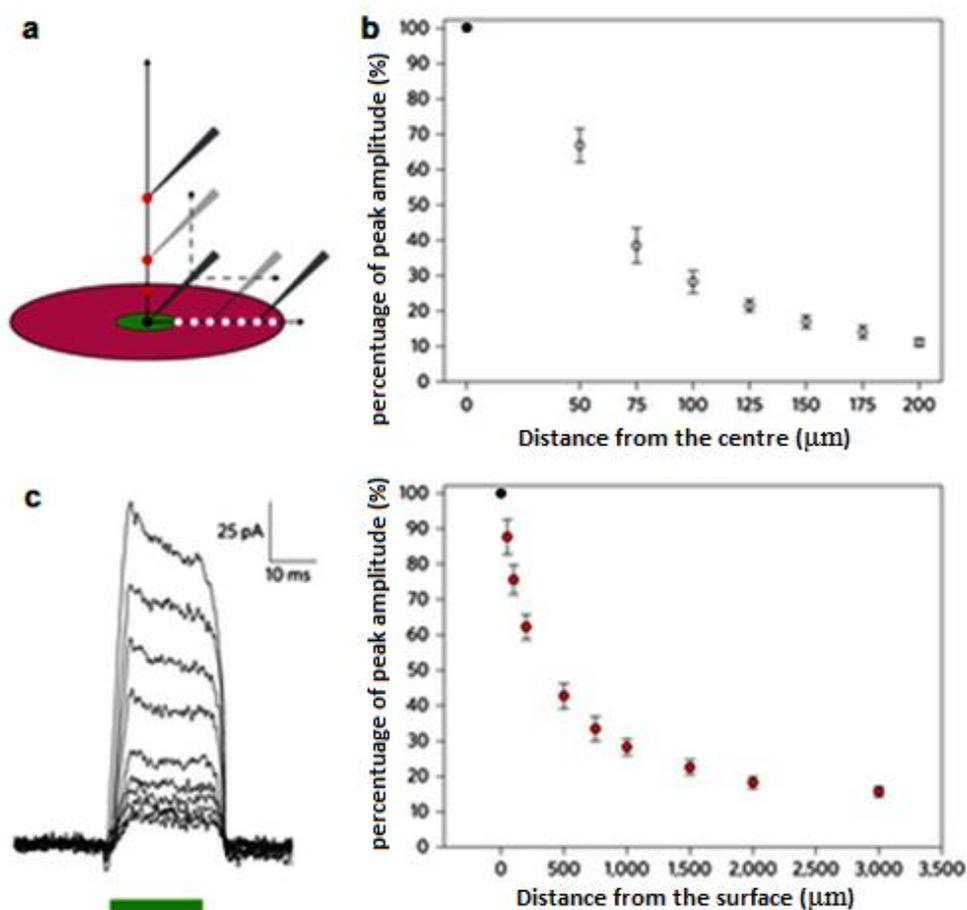


Figura 48 - Misurazione della fotocorrente mediante patch-clamp: a) Posizionamento della pipetta a diverse distanza dal centro della stimolazione luminosa e dalla superficie del polimero. b) Distribuzione della fotocorrente in funzione della distanza dal centro dello spot; c) Decremento dell'intensità della fotocorrente con l'incremento della

distanza dalla superficie polimerica; a destra, distribuzione della fotocorrente in funzione della distanza dalla superficie del polimero.

Per quanto concerne la risoluzione spaziale, è stato dimostrato che il disaccoppiamento fra lo stimolo luminoso e la scarica neuronale avviene ad una distanza fra lo spot e il centro del corpo del neurone maggiore di 20 μm . Questo valore può essere considerato il limite minimo per la risoluzione spaziale del dispositivo ed è stato confermato dall'osservazione del forte decremento della fotocorrente al di sotto di questa distanza (riduzione del 42% a 25 μm dall'applicazione dello spot). Sebbene questo valore non sia comparabile con la risoluzione spaziale e le proprietà di integrazione dei coni retinici, la possibilità di ottenere stimolazioni localizzate (entro un range di 20 μm), utilizzando un mezzo polimerico continuo, rappresenta una qualità distintiva rispetto ai tradizionali dispositivi basati sugli elettrodi.

I dispositivi fotovoltaici futuri potrebbero inoltre beneficiare dell'incorporazione di strati polimerici organici multipli, sensibili a differenti lunghezze d'onda dello spettro visibile. In un sistema di questo tipo, i polimeri possono essere sintonizzati ad avere bandgap accordati con i naturali bandgap di differenti tipi di coni retinici.

Un accurato patterning dei diversi polimeri, armonizzato con la distribuzione dei coni, suggerisce la possibilità di stimolare strati intatti di retina, in patologie degenerative, per recuperare, non soltanto la sensibilità alla luce, ma potenzialmente una sensibilità tricromatica. Tuttavia la visione a colori umana è un meccanismo complesso, legato sia alla retina, sia al cervello e al suo elevato livello di elaborazione dei segnali visivi che consente di raggiungere tre set discriminazione: la luce dal buio, il giallo dal blu e il rosso dal verde. Il ripristino della visione tricromatica richiede molto più delle proprietà ingegneristiche di un impianto in sé, ad esempio il coinvolgimento dei processi biologici e la plasticità cerebrale [39], [41], [42].

IV.2.3 Dispositivi optoelettronici organici

L'incompleta conoscenza dei meccanismi fondamentali neurofisiologici, ostacola attualmente la ricerca di cure per diverse malattie neurologiche e condizioni fisiopatologie del sistema nervoso, come la malattia di Parkinson, l'epilessia o le lesioni del nervo ottico. È necessario pertanto uno sforzo per fornire applicazioni e metodi d'indagine efficienti che consentano la registrazione in tempo reale e la manipolazione dei processi di comunicazione dinamica fra cellule neuronali.

La somiglianza chimica rispetto ai sistemi biologici, le proprietà ottiche e meccaniche e la conducibilità ionica ed elettronica dei semiconduttori organici hanno favorito l'espansione dell'elettronica organica, un campo che possiede i giusti requisiti per lo sviluppo di innovativi strumenti di analisi e modulazione neurofisiologica e fisiopatologica in neuroscienze. La combinazione dell'elettronica organica e delle neuroscienze ha suggerito infatti l'impiego dei semiconduttori organici come interfacce biorganiche, in dispositivi elettronici destinati ad applicazioni e indagini neuroscientifiche. L'utilizzo di materiali organici, sinergicamente combinato con l'elettronica e le neuroscienze, ha lo scopo di ottimizzare le prestazioni dei dispositivi in ambienti fisiologici acquosi, favorire la biocompatibilità con i tessuti neurali e controllare la crescita e l'orientamento delle cellule nervose, con particolare attenzione ad assicurare che i materiali organici e la struttura del dispositivo in diretto contatto con le cellule neurali ne preservino le funzioni fisiologiche e prevengano reazioni gliotiche [50].

La maggior flessibilità e processabilità rispetto ai materiali elettronici tradizionali a base di silicio e la conducibilità ionica ed elettronica rendono i semiconduttori organici adatti alla stimolazione e lettura di eventi bioelettrici, permettono l'uso di dispositivi organici come trasduttori di segnali neurali.

L'integrazione di funzioni fotoniche nell'elettronica organica offre nuove possibilità al campo dell'optoelettronica, che sfrutta le proprietà ottiche e elettroniche dei semiconduttori organici per la progettazione di dispositivi ed applicazioni optoelettronici nel settore dell'imaging e del rilevamento

biomedico. I mezzi organici fotoattivi ed elettroattivi combinano infatti l'elevata efficienza di assorbimento della radiazione elettromagnetica nella regione spettrale compresa fra l'UV e il NIR (near-infrared) con un buon rendimento in termini di fotogenerazione di corrente.

Sono in corso iniziative per lo studio e la realizzazione di biosensori basati su dispositivi optoelettronici organici interfacciati ed integrati con i sistemi viventi, deputati alla stimolazione optoelettronica e alla modulazione dei meccanismi elettrici del sistema nervoso. Questi dispositivi agiscono da trasduttori optoelettronici che, in contatto con il tessuto biologico, misurano variazioni dell'indice di rifrazione o dell'emissione di fluorescenza.

I sistemi viventi scelti sono cellule neurali, cioè le cellule gliali e i neuroni, che saranno interfacciati ed integrati in vitro e in vivo con differenti dispositivi optoelettronici organici, come OLED, OLET, OPD. Biosensori basati su tali dispositivi organici saranno ingegnerizzati e sviluppati per stimolare e registrare l'attività bioelettrica neurale, come l'eccitabilità neuronale e la polarizzazione di membrana, ma anche per modulare la proliferazione cellulare e la progressione di neuriti. L'obiettivo è fornire una nuova comprensione dei processi di comunicazione cellulare delle reti neurali, con impatto su un'ampia varietà di campi, dalla ricerca biomedica alla medicina neuro-rigenerativa. L'iniziativa del progetto europeo Olimpia Project si basa sulla ricerca e sullo sviluppo di questi innovativi dispositivi optoelettronici organici [50].

Una questione importante relativa allo sviluppo di queste nuove tecnologie è la comprensione approfondita dei processi fondamentali che avvengono all'interfaccia biorganica e l'influenza reciproca tra i sistemi neurali e i materiali elettronici. La strategia è quella di utilizzare materiali che non alterino la funzione fisiologica delle cellule neurali e riducano lo stato infiammatorio reattivo, tipicamente osservato con dispositivi impiantati inorganici, implementando invece la biocompatibilità per migliorare l'adesione e la crescita delle cellule sulla superficie dei biosensori organici.

I componenti optoelettronici organici si distinguono in fotoemettitori e fotorivelatori.

Un dispositivo optoelettronico è un fotoemettitore quando è in grado di convertire energia elettrica in una radiazione elettromagnetica. Fra i dispositivi optoelettronici fotoemettitori organici, OLED e OLET si prestano per un'ampia varietà di potenziali applicazioni.

OLED è l'acronimo di Organic Light Emitting Diode, ovvero *diodo organico a emissione di luce*. Si tratta di un diodo ad emissione di luce, che sfrutta le proprietà di materiali organici elettroluminescenti per generare l'emissione di fotoni. Quando un potenziale è applicato fra il catodo e l'anodo, l'OLED produce radiazioni elettromagnetiche. Tra i punti di forza si annoverano soprattutto la leggerezza, la flessibilità, il tempo di risposta e l'alta efficienza energetica.

Il LED organico è un dispositivo a stato solido simile al LED convenzionale ma composto da diversi strati: un substrato di supporto fatto di plastica trasparente o film vetroso, uno strato trasparente che rappresenta l'anodo e cede elettroni, in genere fatto di ossido di indio-stagno, uno strato di polimero organico, uno strato conduttivo che trasporta lacune dall'anodo, fatto di plastica organica, uno strato emettitore che trasporta elettroni dal catodo e fatto di plastica organica, uno strato trasparente oppure metallico che costituisce il catodo ed inietta elettroni.

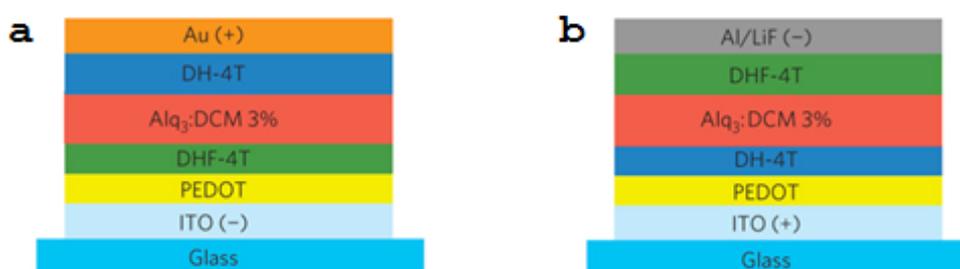


Figura 49 - Struttura schematica di un OLED: a) Configurazione diretta; b) Configurazione inversa.

Il processo di emissione di luce nell'OLED consiste in diversi stadi. Quando una differenza di potenziale è applicata fra anodo e catodo, la corrente fluisce attraverso lo strato organico. Durante il flusso di corrente, il catodo

emette elettroni che colpiscono lo strato emettitore. L'anodo cede elettroni provenienti dallo strato conduttivo creando lacune. Gli elettroni si combinano con le lacune nella giunzione fra gli strati emettitore e conduttivo. Durante l'interazione fra elettroni e lacune, l'energia degli elettroni è emessa sotto forma di fotoni. Il colore dei fotoni dipende dal tipo di materiale organico utilizzato nello strato emettitore e dal salto di energia necessario per il passaggio dell'elettrone dalla banda di conduzione alla banda di valenza quando si ricombina con una lacuna. Maggiore è la corrente, tanto più alto è il ritmo di ricombinazione e quindi l'intensità della radiazione emessa.

L'OLET è un componente a emissione di luce a struttura planare, alternativo all'OLED, che combina nella stessa architettura il meccanismo di switching tipico dei transistor a effetto di campo standard e l'elettroluminescenza dei dispositivi fotoemittitori.

OLET è l'acronimo di Organic Light Emitting Transistor, ovvero *transistor organico a emissione di luce*. Rappresenta un modulatore spaziale di luce che consente di controllare ed amplificare il flusso di luce in uscita e di modularne la frequenza.

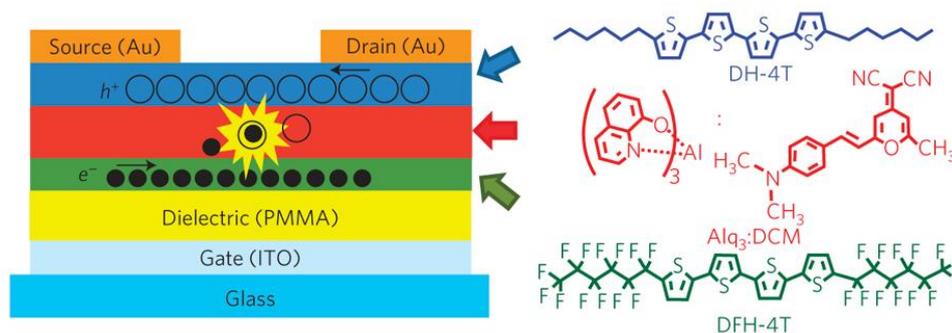


Figura 50 - Architettura a tre strati di un OLET e struttura chimica dei materiali attivi che formano l'eterostruttura. Schematizzazione del processo di trasporto della carica e della fotogenerazione.

Rispetto all'OLED, che è soggetto fenomeni di perdita fotonica e dissipazione della carica degli eccitoni, l'OLET garantisce maggiori prestazioni in termini di efficienza quantica esterna (cioè il rapporto fra i

fotoni emessi e il numero di elettroni iniettati che danno origine a una corrente, indice della potenza luminosa), densità di carica, velocità, flessibilità ed integrazione spaziale monolitica delle componenti fotoniche.

L'architettura ottimale di un OLET consiste in un'eterostruttura a tre strati del tipo canale p/emettitore/canale n. Questo genere di approccio migliora le performance del dispositivo, che risulta oltre 100 volte più efficiente di un equivalente OLED, oltre 2 volte più efficiente di un OLED ottimizzato con lo stesso strato emettitore e oltre 10 volte superiore a ogni altro tipo di OLET riportato. L'eterostruttura è formata da un substrato in vetro/ossido di indio-stagno/PMMA. La regione attiva è caratterizzata dalla sovrapposizione di tre strati organici. Il primo, in contatto con il dielettrico in PMMA, e il terzo strato, sono semiconduttori a effetto di campo rispettivamente di tipo n (trasportatore di elettroni) e di tipo p (trasportatore di lacune), mentre il livello intermedio è una miscela con proprietà di emissione ottica. Questi tre strati sono spessi 62 nm. Il dispositivo è completato dalla deposizione di contatti in oro di 50 nm, come source e drain.

Per consentire il processo di diffusione verticale della carica, base del meccanismo di elettroluminescenza dell'OLET, è necessaria la compatibilità energetica fra i materiali che compongono l'eterostruttura. La morfologia degli strati deve inoltre consentire la formazione di uno mezzo multistack continuo. Il concetto della nuova eterostruttura ha le potenzialità della tecnologia a effetto di campo e dei dispositivi a emissione di luce e restringe i limiti dell'OLED. Un parametro critico da affrontare per il futuro sviluppo della tecnologia OLET è la tensione di funzionamento del dispositivo. L'efficienza energetica, ad una data tensione, è una figura di merito essenziale per qualsiasi dispositivo ad emissione di luce. Devono essere impiegate basse tensioni di funzionamento usando gate isolanti ad alta capacità. Malgrado la necessità di alcuni miglioramenti tecnici e di verifiche di affidabilità e stabilità a lungo termine, questo genere di dispositivo rappresenta una strada percorribile verso dispositivi organici optoelettronici emettitori di luce performanti [51].

Un dispositivo optoelettronico è un fotorivelatore quando converte la radiazione elettromagnetica in un flusso di cariche elettriche. OPD è l'acronimo di Organic Photodetector, ovvero *fotorivelatore organico*. Consiste in un dispositivo che rileva la radiazione elettromagnetica fornendo in uscita un segnale avente un'intensità di corrente o una differenza di potenziale proporzionale all'intensità della radiazione incidente. Essendo di tipo organico, rispetto ai fotorivelatori convenzionali, presenta maggiore sensibilità e gamma dinamica, migliore responsività, più ampio range spettrale, proprietà importanti per dispositivi che devono interfacciarsi ai sistemi neurali. La responsività è un'importante figura di merito espressa come $R = EQE \cdot \lambda q / hc$, dove EQE è l'efficienza quantica esterna (rapporto fra il numero di elettroni che danno luogo a una corrente e il numero di fotoni incidenti), λ è la lunghezza d'onda di interesse, q è la carica dell'elettrone, h è la costante di Planck e c è la velocità della luce. Tra i dispositivi fotorivelatori organici trovano applicazione i fotodiodi e i fototransistori organici. Essi sono caratterizzati da facile sintonizzabilità, integrabilità, elevato rendimento quantico, e dalla possibilità di ottenere selettività in lunghezza d'onda, grazie all'utilizzo di polimeri coniugati sensibili a differenti lunghezze d'onda nella regione spettrale compresa fra l'UV e il NIR. Soddisfano i requisiti di affidabilità e stabilità a lungo termine.

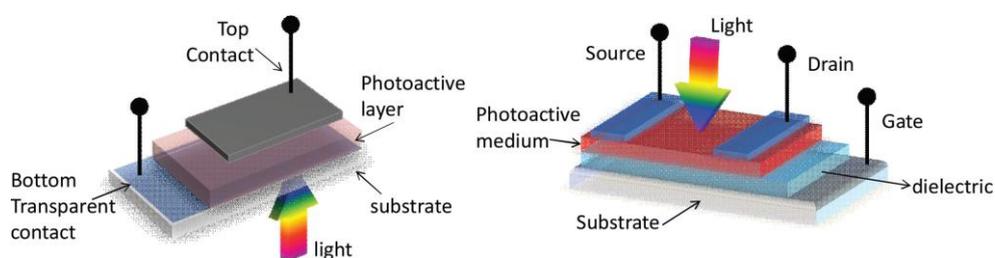


Figura 51-Tipiche configurazioni dei fotorivelatori organici, in particolare di un fotodiodo (a sinistra) e di un fototransistor (a destra).

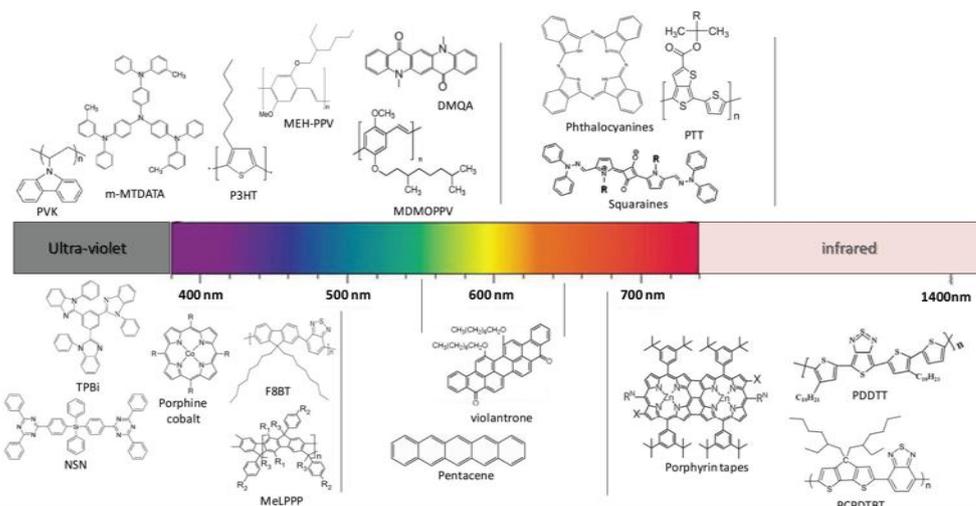


Figura 52 - Polimeri coniugati più utilizzati, sensibili nel range UV-NIR.

I fotodiodi organici hanno maturato un elevato grado di sviluppo, grazie alla costante produzione di materiali organici con proprietà fotovoltaiche, raggiungendo valori di EQE maggiori dell'80% nello spettro del visibile o nel vicino infrarosso. Nei fotorivelatori è possibile applicare un campo elettrico esterno per ottimizzare la generazione e l'accumulo di cariche, incrementando l'efficienza quantica e il tempo di risposta, facendo attenzione a limitare la quantità di cariche iniettate dagli elettrodi, fenomeno che può generare rumore e ridurre la capacità di fotorivelazione del dispositivo. Fotorivelatori molto veloci, in grado di operare a frequenze superiori a 100 MHz, sono caratterizzati da strutture multistrato. I fototransistor organici hanno la stessa configurazione dei transistor a effetto di campo organici, i cui elementi costitutivi sono tre elettrodi (source, gate e drain), uno strato isolante e un film sottile di semiconduttore organico, con la differenza che il flusso di corrente è comandato non solo dalla tensione di gate, ma additionally anche dall'assorbimento di luce. Il fototransistor è un tipo di trasduttore ottico in cui funzioni di rivelazione di radiazioni elettromagnetiche e di amplificazione dei segnali sono combinate in un unico dispositivo. Il modello organico più efficiente ha dimostrato una fotoresponsività di oltre 1200 A/W, un valore di molto superiore rispetto a quello registrato in fototransistor a base di silicio amorfo (300 A/W) [52].

IV.2.4 Dispositivi ibridi

I dispositivi elettronici basati su soluzioni polimeriche facilmente lavorabili e film sottili di nanotubi di carbonio (corpi cilindrici ottenuti dalle strutture sferiche dei fullereni in seguito a rilassamento ed arrotolamento su se stesse) sono tra le più promettenti applicazioni dei materiali organici. Il basso costo della fabbricazione, effettuata mediante tecniche di *coating* e *printing*, è uno dei più grossi vantaggi. Sebbene varie tecniche di deposizione polimerica siano possibili, il processo di *spin-coating* è il metodo di fabbricazione dominante alla base della maggior parte delle attività di ricerca su dispositivi organici a film sottile. Anche se la semplicità e l'efficacia di tale tecnica consentono la realizzazione di film sottili di alta qualità, essa manca di diversi aspetti necessari per una produzione su larga scala. Al fine di sfruttare appieno il potenziale dell'elettronica dei polimeri e dei nanotubi di carbonio, sono necessarie tecnologie per la lavorazione su grandi superfici e a basso costo, adatte per la deposizione di film sottili su substrati e geometrie arbitrari. Una promettente alternativa è data dalla tecnica di *spray deposition*, o deposizione a spruzzo, compatibile con i processi su scala industriale e su grandi superfici. La capacità di seguire anche i contorni superficiali più complessi fornisce il mezzo per stabilire una nuova gamma di potenziali applicazioni in cui è necessaria l'integrazione diretta dei dispositivi elettronici a base di polimeri e nanotubi di carbonio su vari tipi di oggetti [49].

La realizzazione di fotorivelatori e celle fotovoltaiche organiche può impiegare tecniche di *spin-coating* o *spray deposition*, metodiche semplici e a basso costo, che non richiedono alte temperature o sottovuoto. Anche allo stato liquido del semiconduttore esse permettono una deposizione diretta su qualsiasi tipo di substrato, compresi materiali flessibili e combinazioni di materiali organici ed inorganici.

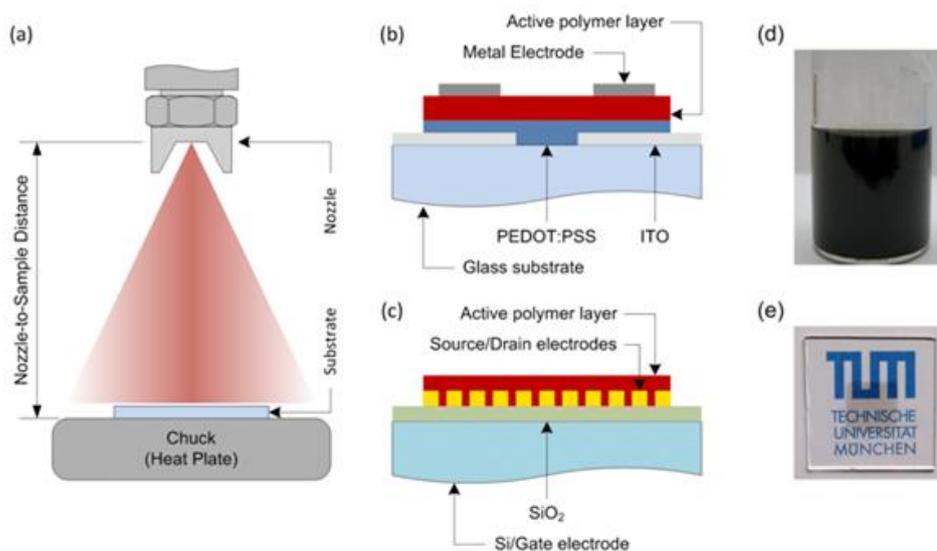


Figura 53 - a) Illustrazione della configurazione statica sperimentale per la spray deposition: componenti di base; b) Layout generale di un fotorivelatore organico, composto da due strati organici inseriti fra due elettrodi; c) Layout generale di un transistor a film sottile organico con un solo strato organico depositato su una struttura elettrodica. Per entrambi i tipi di dispositivi lo strato di polimero attivo è depositato mediante spray deposition; d) Flacone contenente una dispersione acquosa di CNT/surfattante, dopo sonicazione e centrifugazione, pronto per la deposizione; e) Raffigurazione di un film di CNT su vetro, uniformemente depositato su una superficie di 1 cm^2 .

Grazie alle tecniche di deposizione, vari materiali organici che assorbono lunghezze d'onda differenti, possono essere integrati in celle fotovoltaiche pure. La flessibilità e la semplicità di lavorazione della soluzione polimerica dei fotorivelatori organici, può essere anche la chiave per lo sviluppo di tecnologie di imaging ibride, che combinano alcuni vantaggi dei materiali organici con tecnologie a base di silicio, tecnicamente mature, senza aumentare i costi e la complessità di processo. Anche se le prestazioni dei dispositivi optoelettronici organici non possono sorpassare le loro controparti inorganiche, ci sono applicazioni che sfruttano il vantaggio della lavorabilità della soluzione organica. Il basso fattore di riempimento pixel dei sensori di immagini basati su tecnologia CMOS, dovuto alla ridotta sensibilità alla luce, può essere incrementato fino al 100% sostituendo i fotodiodi in silicio con uno strato organico fotoattivo depositato con un

semplice processo di spray coating. Lo strato polimerico sensibile alla luce, essendo collocato alla sommità della struttura ibrida, può raccogliere tutta la radiazione luminosa incidente. Pertanto il dispositivo ibrido risulta nel complesso molto più sensibile dei sensori tradizionali CMOS, che costringono la luce a passare attraverso alcuni strati di pochi nm di spessore prima di raggiungere i fotorivelatori sul wafer di silicio.

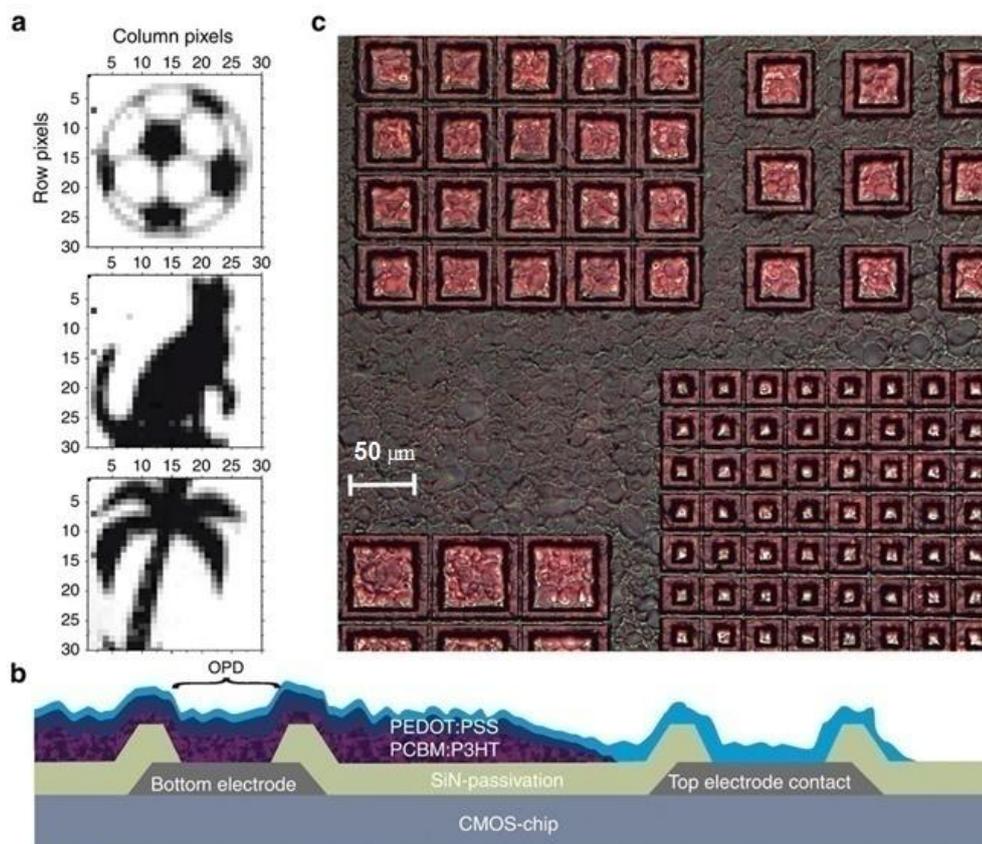


Figura 54 - a) Immagini monocromatiche acquisite da una matrice di pixel 30x30; **b)** Livelli di un dispositivo ibrido (dal basso verso l'alto): CMOS-chip, strato isolante di nitruro di silicio (SiN), strato di alluminio come elettrodo alla base del fotorivelatore organico (OPD), miscela fotoattiva di PCBM:P3HT, strato conduttore di lacune (blu scuro) ed anodo altamente conduttivo (blu chiaro), entrambi composti da PEDOT:PSS (polietilenediossiofene: polistirene sulfonato); **c)** Vista dall'alto del sensore di immagini ibrido, che mostra array di pixel di dimensioni differenti: pixel di 35 μm in alto, pixel di 15 μm in basso. Lo strato organico colorato di rosa, depositato mediante spray deposition, che ricopre i pixel è l'eterogiunzione bulk PCBM:P3HT.

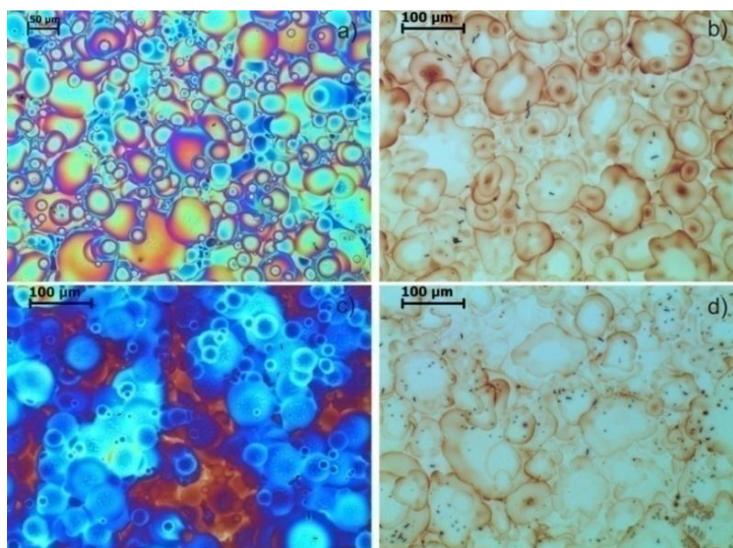


Figura 55 - Immagini microscopiche dello strato PEDOT:PSS depositato mediante spray deposition.

Questo modello ibrido di sensore di immagine CMOS, basato su una soluzione polimerica processabile come strato fotoattivo, può essere molto adatto per nuovi dispositivi di imaging. Inoltre integrando monoliticamente materiali organici differenti al chip è possibile estendere selettivamente la sensibilità del fotorivelatore a specifiche regioni spettrali [40],[49].

Per ottenere risoluzioni elevate, le dimensioni dei pixel dei sensori di immagine CMOS devono essere ridotte a meno di un micron, cosa che a sua volta limita significativamente il numero di fotoni che possono essere catturati da ciascun pixel utilizzando la tecnologia basata sul silicio: ciò implica una perdita di sensibilità. Sovrapponendo un fotodiode organico su un circuito CMOS con fotodiodi a base di silicio, è possibile raddoppiare la superficie della luce incidente di ciascun pixel, mantenendone le dimensioni ma aumentando così la sensibilità e la risoluzione del dispositivo. A tale fine vengono utilizzati materiali semiconduttori organici con proprietà di assorbimento selettivo per lunghezze d'onda corrispondenti al verde, per la fabbricazione di OPD sensibili alla luce verde altamente efficienti, senza filtri di colore. È stato dimostrato che un OPD di questo genere rivela una notevole potenzialità se combinato con un circuito CMOS basato sul silicio di nuova concezione, contenente solo i filtri per il blu e il rosso.

Il presente dispositivo ibrido è un sensore di immagine a colori caratterizzato da una struttura multistrato organica su silicio. Consiste in un OPD che assorbe luce verde (G-light) e la converte in segnale elettrico, collocato su un nuovo circuito CMOS, che presenta filtri per lunghezze d'onda corrispondenti al blu e al rosso. L'affidabilità di questa architettura è stata verificata: una vera immagine a colori completa è stata acquisita con successo da una macchina fotografica contenente il sensore di immagine a colori ibrido.

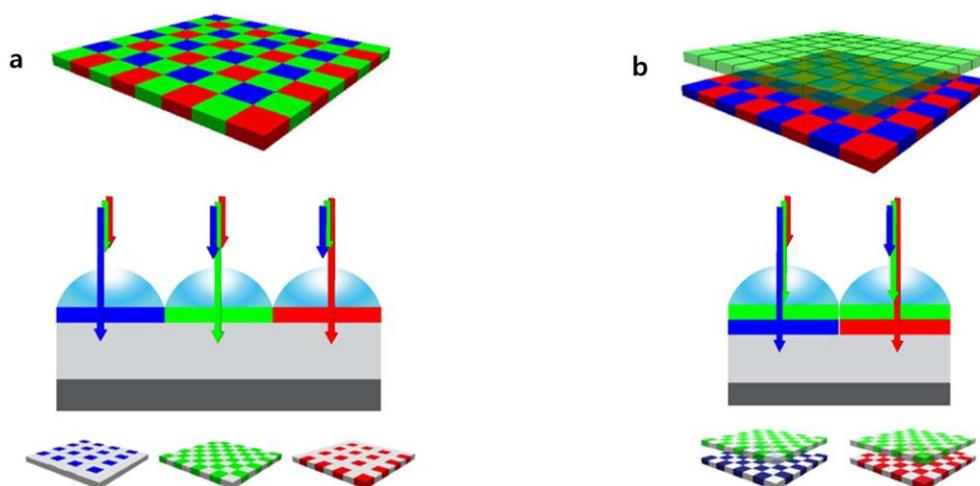


Figura 56 - a) Diagramma di un convenzionale sensore di immagine CMOS. Ogni pixel misura l'intensità della luce che passa attraverso i filtri per il blu, il verde ed il rosso; b) Diagramma di un sensore ibrido multistrato: il G-OPD è posto superiormente ai filtri per il rosso e il blu. Il G-OPD rileva l'incremento di luce verde, dopodiché il sottostante fotorivelatore al silicio intercetta selettivamente l'aumento di luce blu e rossa attraverso i rispettivi filtri.

Un'eterogiunzione bulk a base di DM-2,9-DMQA e SubPc è stata fabbricata, come elemento chiave del fotorivelatore organico G-light selettivo, dimostrando proprietà di assorbimento nelle frequenze del verde, alta efficienza di conversione, stabilità termica, rapidità di risposta.

La miscela dell'eterogiunzione bulk è composta da DM-2,9-DMQA (Dimetil-2,9-dimetil-quinacridone), che agisce da elettrone-donatore (p-type), e SubPc (Cloruro di sub ftalocianina di boro), che costituisce l'elettrone-accettore (n-type).

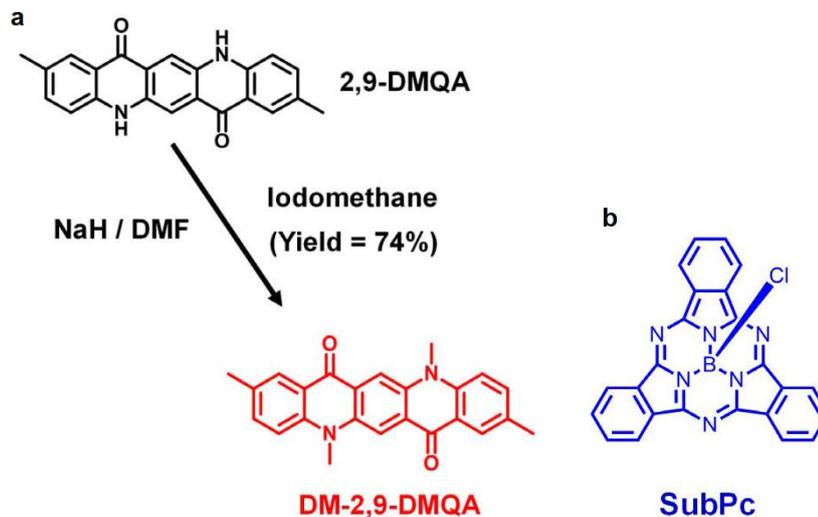


Figura 57 - a) Sintesi e struttura molecolare del DM-2,9-DMQA; b) Struttura molecolare del SubPc.

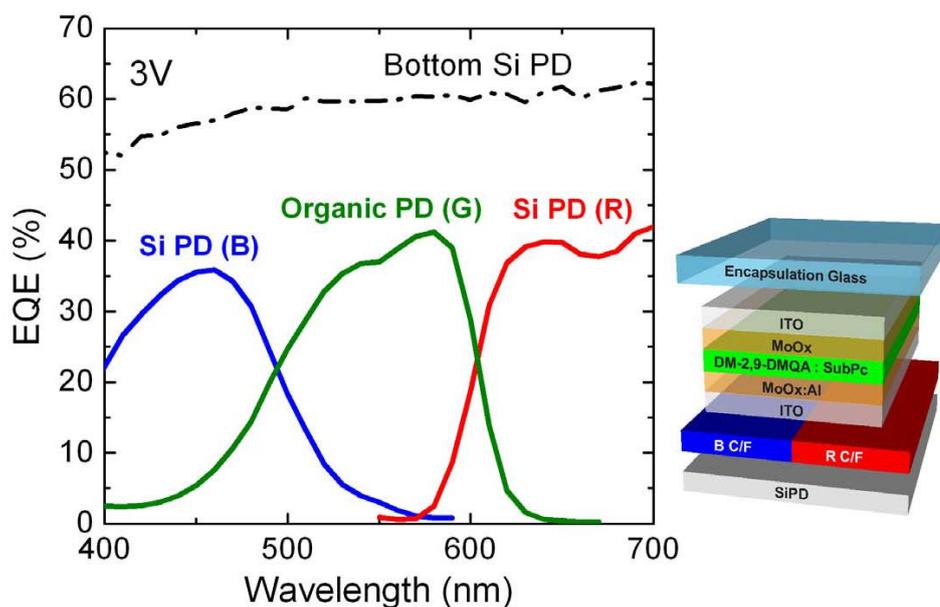


Figura 58 - Curva dell'efficienza quantica esterna dei fotorivelatori organici (G-PD) e inorganici (B-Si PD, R-Si PD). Le EQE delle regioni R e B sono state misurate nei sottostanti fotorivelatori al silicio, sui quali sono posizionati i filtri per il rosso e il blu e il G-OPD. L'EQE del G-OPD è stata misurata direttamente ad una tensione di funzionamento di 3 V.

Maggiore qualità può essere ottenuta con successo incrementando la sensibilità del G-OPD e mediante ulteriori modifiche strutturali dell'architettura del circuito CMOS sottostante. La nuova generazione di

sensori di immagine ibridi multistrato è altamente promettente in termini di sensibilità e risoluzione poiché essi garantiscono il raddoppiamento della superficie di incidenza delle onde elettromagnetiche, in un dato pixel [53].

CONCLUSIONE

La ricerca di soluzioni bioingegneristiche per il recupero della funzionalità della retina in condizioni fisiopatologiche, coinvolge differenti aree di studio, come la medicina, la biologia, le neuroscienze, l'elettronica, la chimica dei materiali. La convergenza e l'integrazione di queste discipline ha reso possibile la realizzazione di sistemi artificiali e tecniche di modulazione dell'attività neuronale sempre più efficaci e promettenti.

Allo stato dell'arte, gli impianti protesici visivi di maggior successo ed attualmente autorizzati al commercio in Unione Europea, sono il sistema epiretinale Argus II (Second Sight Medical Products) e il dispositivo subretinale Alpha IMS (Retina Implant AG). La sperimentazione clinica di tali retine elettroniche ha dimostrato miglioramenti significativi in termini di mobilità, riconoscimento di oggetti e lettere, discriminazione dei contrasti luminosi ed orientamento in ambienti familiari, in soggetti colpiti da cecità dovuta a forme avanzate di degenerazione retinica. Negli ultimi due decenni, il progressivo percorso di sviluppo dei sistemi per la visione artificiale ha raggiunto l'obiettivo di restituire ai pazienti una parziale sensazione visiva, garantendo la biostabilità e la sicurezza degli impianti, mentre restano da migliorare aspetti legati alla biocompatibilità dell'interfaccia dispositivo-cervello, all'alimentazione esterna, alla dissipazione del calore nei tessuti biologici, all'isolamento dei componenti elettronici dal mezzo fisiologico, al numero e alle dimensioni degli elettrodi, alla qualità della risoluzione spaziale e temporale. È allo studio e al perfezionamento di questi parametri che è diretta la ricerca attuale.

Fra gli approcci alternativi alla stimolazione elettrica per il trattamento di retinopatie degenerative, le tecniche ottiche di modulazione dell'attività neuronale hanno manifestato la possibilità di recuperare la sensibilità delle cellule alla luce, mediante l'applicazione di cromofori esogeni e molecole photoswitch, e suscitare risposte nervose, utilizzando la fotostimolazione del

tessuto. La tecnologia optogenetica sta emergendo come potenziale metodo, preciso e veloce, volto a rendere i fotorecettori inattivi nuovamente responsivi agli impulsi luminosi e la sperimentazione su animali ne ha confermato la validità. Tuttavia, questioni legate alla sicurezza, alla legislazione e alla bioetica nell'ambito della manipolazione genetica, ne vincolano la sperimentazione su umani. Accanto alle tecniche ottiche e optogenetiche, la fotostimolazione neurale per mezzo di polimeri fotovoltaici di natura organica si è rivelata una delle più stimolanti prospettive di frontiera.

Gli impianti retinali esistenti sono a base di metallo-silicio. Le ricerche più recenti svolte presso l'IIT, indicano la probabile strada che porterà alla realizzazione di una retina artificiale organica per l'uomo. Utilizzando materiali di tipo polimerico è possibile costruire un'interfaccia diretta con dei sistemi neurali coltivati sul materiale fotosensibile. I risultati ottenuti dimostrano che il tessuto retinico compromesso posto in contatto con lo strato organico riacquista fotosensibilità e genera segnali elettrici. La struttura molecolare composta da atomi di carbonio, simile a quella dei tessuti biologici, la capacità di condurre sia elettroni sia ioni e la natura soffice favoriscono la biocompatibilità dei polimeri organici, rendendoli adatti all'interazione con i sistemi viventi. La sensibilità intrinseca alla luce, l'elevata risoluzione spaziale e temporale, la flessibilità, il ridotto impatto dei processi di ossidazione-riduzione ne confermano la possibile applicazione nel campo della visione artificiale, come valida alternativa ai semiconduttori inorganici.

Al contempo, la progettazione di nuovi dispositivi elettronici ibridi combina la consolidata tecnologia tradizionale inorganica con i vantaggi dei materiali organici.

Le indagini future stabiliranno se l'impiego di polimeri semiconduttori avrà successo nell'implementazione di una protesi retinica artificiale a base organica, destinata a restituire il senso della vista a pazienti affetti da degenerazione retinica. Al momento la ricerca sta testando in modo

approfondito la biocompatibilità a lungo termine, l'efficienza e la durata dei materiali organici utilizzati, muovendosi verso test di impianti in-vivo.

Anche se il range dinamico dei polimeri organici non è comparabile con i range di luminanza che coni e bastoncelli possono gestire, essi sono in grado di agire come fotorecettori artificiali in un modello di retina espantata, suggerendo il possibile sviluppo di una nuova generazione di dispositivi organici per impianti subretinali, indipendenti da sorgenti di alimentazione esterna e con sensibilità all'irradianza compatibile con i livelli fisiologici di illuminazione.

Nuove prospettive potrebbero inoltre essere aperte da protesi ibride/organici che combinino i progressi della nanomedicina con quelle dei biomateriali naturali e nanostrutturati, integrando nell'impianto retinico biomateriali che rilascino fattori di crescita (Benfenati et al., 2010; 2012).

Si evince pertanto che approcci combinati di scienza dei materiali dell'ingegneria biomedica, imaging, modelling-matematico e neuroscienze applicate, potrebbero aprire nuove frontiere nell'ambito di approcci tecnologici innovativi per il recupero della funzionalità retinica nelle condizioni fisiopatologiche qui descritte.

BIBLIOGRAFIA/SITOGRAFIA

- [1]Eric R. Kandel, James H. Schwartz, Thomas M. Jessell, “Principi di neuroscienze”, casa editrice Ambrosiana, 2003, 3ed, CAP. 25,26,27,28,29
- [2]D.U. Silverthorn, “Fisiologia – un approccio integrato”, casa editrice Ambrosiana, 2007, 3ed, CAP. 10
- [3]David H. Hubel, “Occhio, cervello e visione”, Zanichelli editore, 1989
- [4]https://it.wikipedia.org/wiki/Legge_di_Weber-Fechner
- [5]Carlo Sborgia, Nicola delle Noci, “Malattie dell’apparato visivo”, Piccin, 2004, CAP. 3,14
- [6]<http://www.iapb.it/>
- [7]<http://www.retina.ch/it/retinajournal/>
- [8]Hamel C., “Retinitis pigmentosa”, Orphanet Journal of Rare Diseases, 2006 Oct
- [9]Ferrari S., Di Iorio E., Barbaro V., Ponzin D., Sorrentino F.S., Parmeggiani F., “Retinitis pigmentosa: genes and disease mechanisms”, Current Genomics, 2011 Jun
- [10]Fahim AT, Daiger SP, Weleber RG, ”Retinitis Pigmentosa Overview”, Gene Reviews, 2013 Mar
- [11]Aswani Dutt Vadlapudi, Ashaben Patel, Kishore Cholkar, Ashim K. Mitra, “Recent Patents on Emerging Therapeutics for Treatment of Glaucoma, Age Related macular Degeneration and Uveitis”, NIHPA Author Manuscripts, 2012 Apr
- [12]<http://www.neuroftalmologia.it/>
- [13]<http://www.retina3000.it/>
- [14]<http://www.retinitepigmentosa.it/prospettive-terapeutiche-da-diagnosi-molecolare/>
- [15]<http://www.brunolumbroso.it/>
- [16]<http://www.who.int/blindness/GLOBALDATAFINALforweb.pdf?ua=1>

- [17]Fatih Cakir Gundogan, Ahmet Tas, Gungor Sobaci, “Electroretinogram in Hereditary Retinal Disorders”, ”Electroretinograms”, Dr. Gregor Belusic (Ed), Ophthalmology, InTech, 2011 Aug
- [18]John G. Webster, ”Medical Instrumentation, Application and Design”, “The electroretinograms”, John Wiley & Sons, 2009, 4ed
- [19]<http://www.secondsight.com/>
- [20]<http://www.bostonretinalimplant.org/>
- [21]<http://optobionics.com/>
- [22]Eyal Margalit, Mauricio Maia, James D. Weiland, Robert J. Greenberg, Gildo Y. Fujii, Gustavo Torres, Duke V. Piyathaisere, Thomas M. O’Hearn, Wentai Liu, Gianluca Lazzi, Gislin Dagnelie, Dean A. Scribner, Eugene de Juan Jr, Mark S. Humayun, “Retinal Prosthesis for the Blind”, Major review, Survey of Ophthalmology, Elsevier Science, 2002 Jul-Aug
- [23]James D. Weiland, Wentai Liu, Mark S. Humayun, “Retinal Prosthesis”, Annu. Rev. Biomed. Eng., 2005 Mar
- [24]Edwin M. Maynard, “Visual Prostheses”, Annu. Rev. Biomed. Eng., 2001
- [25]James D. Weiland, Mark S. Humayun, “Visual Prosthesis”, Proceedings of the IEEE, 2008 Jul
- [26]Jessy D. Dorn, Ashish K. Ahuja, Avi Caspi, Lyndon da Cruz, Gislin Dagnelie, Jose-Alain Sahel, Robert J. Greenberg, Matthew J. McMahon, “The Detection of Motion by Blind Subjects with the Epiretinal 60-Electrode (Argus II) Retinal Prosthesis”, Jama Ophthalmol., Feb 2013
- [27]H. Christiaan Stronks, Gislin Dagnelie, “The functional performance of the Argus II retinal prosthesis”, NIHPA Author Manuscript, Expert Rev Med Devices, 2014 Jan
- [28]Eberhart Zrenner, Karl Ulrich Bartz-Schmidt, Heval Benav, Dorothea Besch, Anna Bruckmann, Veit-Petr Gabel, Florian Gekeler, Udo Greppmaier, Alex Harscher, Steffen Kibbel, Johannes Koch, Akos Kusnyerik, Tobias Peters, Katarina Stingl, Helmut Sachs, Alfred Stett, Peter Szurman, Barbara Wilhelm, Robert Wilke, “Subretinal electronic chips

- allow blind patients to read letters and combine them to words”, Proceedings of the Royal Society, 2010 Oct
- [29]Joseph F. Rizzo, “Update on Retinal Prosthetic Research: The Boston Retinal Implant Project”, Journal of Neuro-Ophthalmology, 2011 Jun
- [30]Shawn K. Kelly, Douglas B. Shire, Jinghua Chern, Patrick Doyle, Marcus D. Gingerich, Stuart F. Cogan, William A. Drohan, Sonny Behan, Luke Theogarajan, John L. Wyatt, Joseph F. Rizzo, “A Hermetic Wireless Subretinal Neurostimulator for Vision Prostheses”, IEEE transaction on biomedical engineering, 2011 Nov
- [31]Jong Min Ong, Lyndon da Cruz, “The bionic eye: a review”, Clinical and Experimental Ophthalmology, 2012 Jan-Feb
- [32]Yvonne H. - L. Luo, Lyndon da Cruz, “A review and update on the current status of retinal prostheses (bionic eye)”, British Medical Bulletin, 2014 Jan
- [33]Tohru Yagi, “Biohybrid Visual Prosthesis for Restoring Blindness”, International journal of applied biomedical engineering”, 2009
- [34] https://it.wikipedia.org/wiki/Protesi_MARC
- [35] https://it.wikipedia.org/wiki/Impianto_visivo_Dobelle
- [36]R. Pietrabissa, “Biomateriali per protesi e organi artificiali”, Patron Editore, 1996
- [37] <http://www.centropiaggio.unipi.it/>
- [38]Christian Kock, “EPI-RET-3: A wireless retina implant system”
- [39]Duco Endeman, Paul Feyen, Diego Ghezzi, Maria Rosa Antognazza, Nicola Martino, Elisabetta Colombo, Guglielmo Lanzani, Fabio Benfenati, “The Use of Light-Sensitive Organic Semiconductor to Manipulate Neuronal Activity”, Novel Approaches for Single Molecule Activation and Detection, Advances in Atom and Single Molecule Machines, 2014 Jun
- [40]N. Martino, D. Ghezzi, F. Benfenati, G. Lanzani, M. R. Antognazza, “Organic semiconductors for artificial vision”, Journal of Material Chemistry B, 2013 Apr

- [41]D. Ghezzi, M. R. Antognazza, M. Dal Maschio, E. Lanzarini, F. Benfenati, G. Lanzani, “A hybrid bioorganic interface for neuronal photoactivation”, Nature Communication, 2011 Jan
- [42]Diego Ghezzi, Maria Rosa Antognazza, Rita Maccarone, Sebastiano Bellani, Erica Lanzarini, Nicola Martino, Maurizio Mete, Grazia Pertile, Silvia Bisti, Guglielmo Lanzani, Fabio Benfenati, “A polymer optoelectronic interface restores light sensitivity in blind rat retinas”, nature photonics, 2013 Mar
- [43]Vini Gautam, David Rand, Yael Hanein, K. S. Narayan, “A Polymer Optoelectronic Interface Provides Visual Cues to a Blind Retina”, Advanced Materials, 2013
- [44]Vini Gautam, K. S. Narayan, “Polymer optoelectronic structures for retinal prosthesis”, Organogenesis, 2014 Jan
- [45]Karl Deisseroth, “Optogenetics”, Nature Methods, 2010 Dec
- [46]<http://download.kataweb.it/mediaweb/pdf/espresso/scienze/2011/11/14/122600707-e11d94a5-ec95-4c15-a2c2-7aa87d0388b0.pdf>
- [47] <https://it.wikipedia.org/wiki/Optogenetica>
- [48]http://www.salute.gov.it/imgs/C_17_pubblicazioni_1850_allegato.pdf
- [49]<http://www.nano.ei.tum.de/>
- [50]<http://www.olimpiaproject.eu/>
- [51]Raffaella Capelli, Stefano Toffanin, Gianluca Generali, Hakan Usta, Antonio Facchetti, Michele Muccini, “Organic light emitting transistor with an efficiency that outperforms the equivalent light emitting diodes”, Nature Materials, 2010 May
- [52]Kang-Jun Baeg, Maddalena Binda, Dario Natali, Mario Caironi, Yong-Young Noh, “Organic Light Detectors: Photodiodes and Phototransistors”, Advanced Materials, 2013
- [53]Seon-Jeong Lim, Dong-Seok Leem, Kyung-Bae Park, Kyu-Sik Kim, Sangchul Sul, Kyoungwon Na, Gae Hwang Lee, Chul-Joon Heo, Kwang-Hee Lee, Xavier Bulliard, Ryu-Ichi Satoh, Tadao Yagi, Takkyun Ro, Dongmo Im, Jungkyu Jung, Myungwon, Tae-Yon Lee, Moon Gyu Han,

Yong Wan Jin, Sangyoon Lee, “Organic-on-silicon complementary metal-oxide-semiconductor colour image sensor”, Scientific Reports, 2015 Jan

RINGRAZIAMENTI

Guardando in retrospettiva il percorso svolto fino ad ora, posso affermare che quanto in precedenza sembrava lontano e talvolta impossibile, oggi si è verificato.

Dedico i miei più sinceri ringraziamenti a coloro che, durante questi anni, sono stati presenti, per me e accanto a me.

Ringrazio la Prof.ssa Valentina Benfenati, che mi ha seguita e guidata nell'elaborazione di questo lavoro di tesi, con professionalità e umanità.

Grazie alla mia famiglia, non solo per i sacrifici e il supporto economico, ma soprattutto per essere la mia principale sorgente di forza. Mi è stata vicina in tutti i momenti più duri, credendo in me.

Prezioso è stato anche il sostegno dei miei amici più cari, a cui sono grata perché hanno saputo trasmettermi grinta e solidarietà.

Ringrazio infine la facoltà di Ingegneria, poiché ritengo che dia a noi studenti la possibilità non solo di acquisire le specifiche conoscenze, altresì di imparare un atteggiamento, una modalità di approccio critico e flessibile alla risoluzione dei problemi.