



**UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PADOVA**



DIPARTIMENTO DI INGEGNERIA DELL'INFORMAZIONE

CORSO DI LAUREA IN INGEGNERIA BIOMEDICA

BIOSEGNALI DEL SISTEMA VISIVO

Relatore: Prof.ssa Sarah Tonello

Laureando: Sebastiano Toniolo

ANNO ACCADEMICO 2021–2022

Data di laurea 21/07/2022

INDICE

1. Abstract	4
2. Cenni sul sistema nervoso	5
2.1 Anatomia macroscopica	5
2.2 Anatomia microscopica	7
2.3 Segnali prodotti e trasmessi	9
3. Sistema visivo	11
3.1 Anatomia	11
3.2 Fisiologia	15
3.3 Principali patologie	19
4. Metodi per la valutazione del sistema visivo	22
4.1 Elettroencefalogramma	22
4.2 Potenziali evocati visivi	25
4.3 Elettrooculogramma	28
4.4 Elettroretinogramma	33
4.5 Bioimmagini retiniche	45
5. Sperimentazione della visione artificiale	52
5.1 Impianti neurali	52
5.2 Impianti retinici	58
6. Considerazioni finali	63
7. Bibliografia	65

1. Abstract

Il sistema nervoso permette agli esseri umani e alle altre specie viventi che ne sono provviste di interagire con l'ambiente circostante. I neuroni sono le unità funzionali di tale sistema e comunicano tra loro attraverso segnali elettrici e chimici.

Il sistema visivo è strettamente connesso al sistema nervoso centrale, esso permette la trasduzione delle radiazioni luminose captate da milioni di fotorecettori in impulsi nervosi elaborati in molteplici zone dell'encefalo. Per comprendere il funzionamento e lo stato di tale sistema è possibile acquisire segnali come l'elettrooculogramma (EOG), l'elettroretinogramma (ERG), l'elettroencefalogramma (EEG), dal quale è possibile estrarre i potenziali evocati visivi (VEP), e le bioimmagini retiniche.

Il corretto funzionamento del sistema visivo può essere compromesso da molteplici patologie spesso incurabili. Nel corso dell'ultimo secolo la ricerca scientifica ha ottenuto notevoli risultati nel campo dell'elettrostimolazione della via visiva. Al momento sono in via di sviluppo e in fase di test progetti di protesi retiniche e impianti neurali che promettono di ristabilire in parte le capacità visive dei soggetti colpiti da patologie irreversibili.

2. Cenni sul sistema nervoso

2.1 Anatomia macroscopica

Il sistema nervoso è costituito da una fitta rete di cellule specializzate, ovvero i neuroni, che comunicano rapidamente tra loro al fine di controllare l'organismo. Tale sistema riceve in ingresso degli stimoli provenienti dall'esterno o dall'interno dell'organismo i quali vengono elaborati dai circuiti neurali del sistema nervoso centrale al fine di produrre in uscita delle risposte. Questo è reso possibile da recettori sensoriali distribuiti in tutto il corpo che sono in grado di percepire le più piccole variazioni nelle condizioni dell'ambiente interno ed esterno. I recettori, tramite le vie di conduzione afferenti, inviano informazioni al sistema nervoso centrale che le integra determinando o meno una risposta. La risposta viene condotta attraverso le vie efferenti del sistema nervoso fino agli organi target [1].

Dal punto di vista anatomico macroscopico il sistema nervoso può essere considerato suddiviso in due aree con caratteristiche e funzioni differenti: sistema nervoso periferico (SNP) e sistema nervoso centrale (SNC). Uno schema strutturale è mostrato in figura 1.

Il sistema nervoso periferico ha la funzione di condurre i segnali nervosi tra il sistema nervoso centrale e le altre zone del corpo. In particolare si riconosce una divisione afferente, costituita dai neuroni sensoriali, e una divisione efferente, che trasmette il segnale dal SNC verso la periferia, tramutando il messaggio in una risposta meccanica del muscolo target. La parte efferente si suddivide ulteriormente in sezione motoria somatica, che controlla i muscoli scheletrici, e sezione autonoma, che controlla muscolatura liscia, miocardio e ghiandole. La sezione autonoma, o sistema nervoso autonomo, è a sua volta caratterizzata da due differenti branche: il sistema nervoso simpatico e il sistema nervoso parasimpatico, i due cooperano in antagonismo sui medesimi bersagli al fine di regolare la risposta sfruttando neurotrasmettitori differenti. Esiste una terza parte del sistema nervoso periferico, ovvero il sistema nervoso enterico. Esso è costituito da una rete di neuroni localizzata nelle pareti del tratto digerente, e seppur sotto l'influenza del sistema nervoso autonomo, il sistema nervoso enterico è in grado di svolgere le sue funzioni di regolazione del tratto digerente in autonomia.

Il sistema nervoso centrale è costituito dall'encefalo e dal midollo spinale (figura 2). Mentre il midollo spinale funge da collegamento tra SNC e SNP limitandosi ad integrare i cosiddetti riflessi spinali come il riflesso patellare, l'encefalo si occupa di integrare ed elaborare tutte le informazioni derivanti dal SNP oltre che essere sede dei processi cognitivi [1-2].

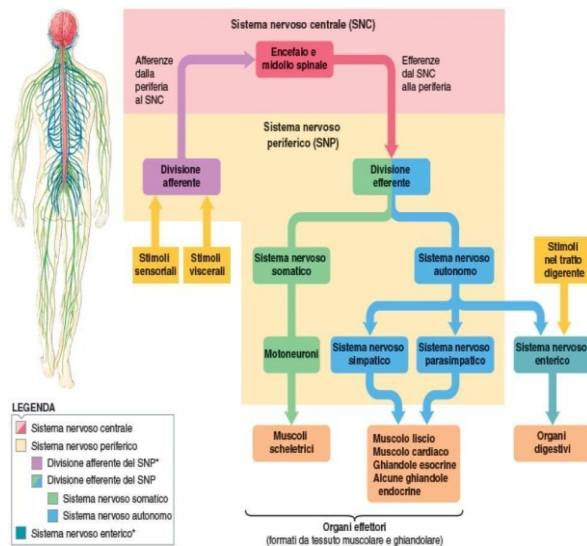


Figura 1. Organizzazione del sistema nervoso umano [1].

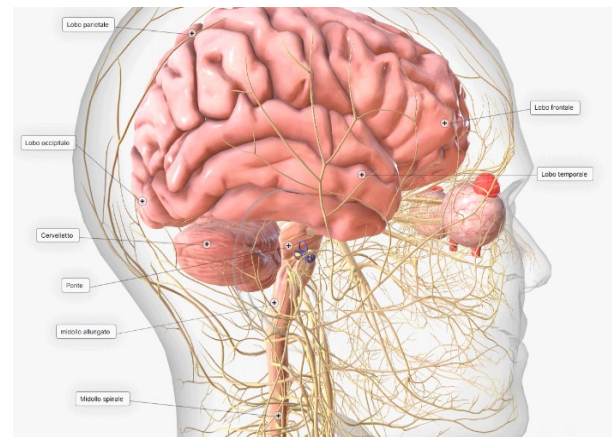


Figura 2. Illustrazione del sistema nervoso centrale.

È possibile distinguere varie zone dell'encefalo in base alla loro funzione e natura anatomica che cooperano strettamente tra loro. Il tronco encefalico costituisce il prolungamento del midollo spinale, comprende il bulbo, il ponte e il mesencefalo. In questa zona avviene lo smistamento dei segnali afferenti e il controllo delle funzioni vegetative. Il cervelletto, situato nella zona posteriore dell'encefalo e superiore al tronco encefalico, si occupa della coordinazione inconscia dell'attività motoria, come l'equilibrio. Sopra il tronco encefalico si trova il diencefalo composto dal Talamo, che si occupa di smistare i segnali sensoriali verso le zone superiori, e l'ipotalamo, che svolge importanti funzioni omeostatiche e neuroendocrine. La parte superiore dell'encefalo è detta telencefalo ed è formato da due emisferi connessi tra loro dal corpo calloso, un insieme di migliaia di assoni, che permette la connessione anche a livello funzionale dei due emisferi. Il telencefalo è composto da sostanza grigia, formata da corpi cellulari neuronali e gliali densamente impaccati e dendriti, e bianca, formata dai fasci di assoni mielinizzati. In particolare la sostanza grigia si trova in profondità, a formare i nuclei della base e all'esterno, a formare la corteccia cerebrale, una lamina sottile composta da sei strati paralleli. Su ogni emisfero del telencefalo, grazie ai riferimenti anatomici costituiti da solchi particolarmente profondi, si possono riconoscere quattro lobi differenti: frontale, parietale, temporale e occipitale [1].

Sulla corteccia si possono individuare delle regioni funzionali specializzate, ovvero delle regioni maggiormente attive durante il compimento di un'attività. In generale si distinguono: le aree sensoriali, che elaborano i segnali sensoriali per determinare le percezioni; le aree motorie, maggiormente implicate nei movimenti volontari; le aree associative, che integrano le informazioni provenienti da più aree funzionali differenti al fine di implementare le funzioni cognitive superiori. Tali aree spesso non corrispondono con i lobi anatomici oltre che presentare

una certa asimmetria tra gli emisferi, per esempio le facoltà linguistiche tendono ad essere concentrate nell'emisfero sinistro. In particolare si riconoscono le seguenti aree sensoriali (figura 3): la corteccia somatosensoriale primaria, nel lobo parietale, è deputata all'integrazione di segnali come tatto, dolore, temperatura e posizione del corpo; la corteccia visiva, nel lobo occipitale, riceve gli stimoli dalla retina; la corteccia uditiva, nel lobo temporale, elabora i segnali provenienti dall'apparato uditivo; la corteccia olfattiva, situata nel lobo temporale, riceve i segnali dai chemocettori nasali; la corteccia gustativa, nel lobo frontale, integra i segnali provenienti dalle papille gustative [2].

Le aree funzionali si possono individuare in maniera non invasiva sfruttando tecnologie di *imaging* funzionale come la tomografia ad emissione di positroni (PET), la risonanza magnetica funzionale (fMRI) oppure costruendo mappe topografiche attraverso elettroencefalogramma (EEG).

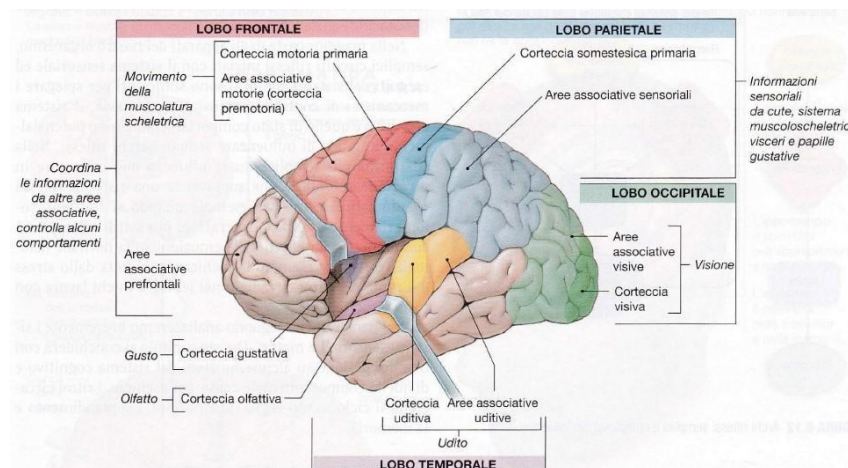


Figura 3. Illustrazione delle aree funzionali dell'encefalo

2.2 Anatomia microscopica

Il sistema nervoso è costituito da neuroni e cellule gliali. Mentre i neuroni svolgono le funzioni di conduzione ed elaborazione delle informazioni, le cellule gliali svolgono molteplici funzioni di supporto essenziali all'attività dei neuroni.

Il neurone è l'unità funzionale del sistema nervoso, è caratterizzato da un corpo cellulare detto soma dal quale dipartono lunghi processi detti dendriti, se ricevono i segnali in ingresso, o assini, se conducono i segnali d'uscita (figura 4). Più diramati sono i dendriti, maggiore è la capacità del neurone di interagire con altri neuroni [2].

Le sinapsi (figura 5) sono regioni in cui un terminale assonico comunica con la cellula bersaglio, si identifica quindi una cellula presinaptica, che trasmette il segnale, e una cellula postsinaptica,

che acquisisce il segnale. Le sinapsi sono caratterizzate da una fessura sinaptica, spazio riempito di matrice extracellulare nel quale avviene l'eventuale scambio di molecole tra le due cellule. Esistono sinapsi chimiche per le quali la cellula presinaptica rilascia neurotrasmettitori che diffondono attraverso la fessura sinaptica andando a legare i recettori di membrana sulla cellula postsinaptica, e sinapsi elettriche per cui le cellule coinvolte sono in contatto attraverso dei canali di giunzione che consentono la diretta trasmissione dell'impulso elettrico [2].

I neuroni sono delle cellule morfofunzionali poiché in base alla loro funzione assumono delle forme differenti, per questo è possibile classificarli in base alla forma e in base alla funzione.

In base alla forma (figura 6), ovvero al numero di processi che dipartono dal soma, si distinguono: neuroni multipolari, neuroni pseudounipolari, neuroni bipolari e piramidali.

In base alla funzione si possono distinguere: neuroni sensoriali o afferenti, conducono informazioni dai recettori sensoriali al SNC; interneuroni, si trovano completamente all'interno del SNC e spesso hanno processi ramificati abbastanza complessi che consentono loro di comunicare con molti altri neuroni; neuroni efferenti, sia motori somatici sia autonomi, conducono il segnale dal SNC al SNP. I lunghi assoni dei neuroni periferici afferenti ed efferenti, unitamente a tessuto connettivo, formano i nervi che si estendono dal SNC ai tessuti e agli organi bersaglio. Esistono nervi solo afferenti, solo efferenti e misti i quali consentono la trasmissione del segnale in entrambi i versi [2].

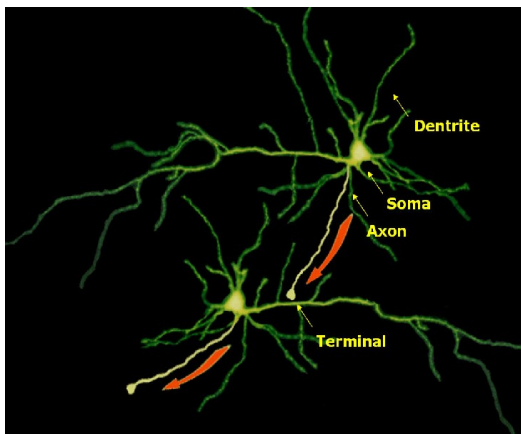


Figura 4. Veri neuroni colorati con una sostanza fluorescente e osservati al microscopio.

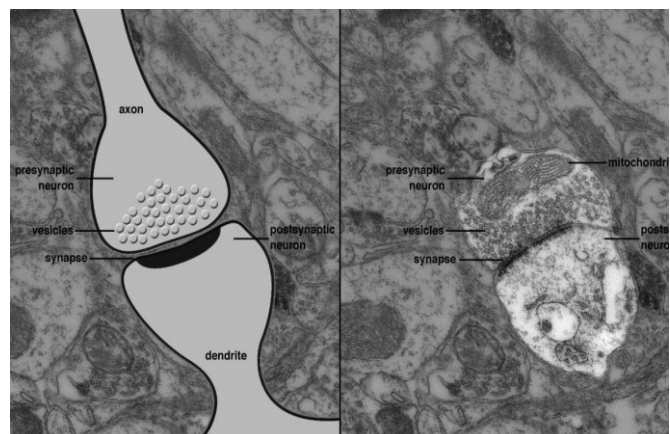


Figura 5. Sinapsi al microscopio elettronico.

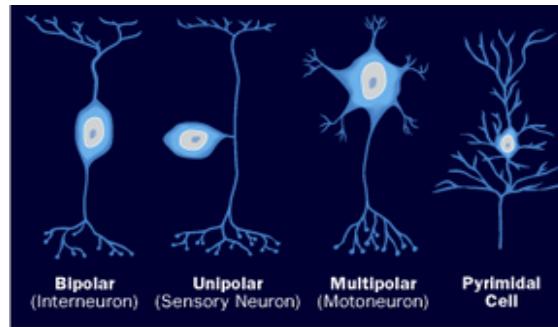


Figura 6. Illustrazione dei principali tipi di neurone.

Le cellule gliali (figura 7) costituiscono il 90% del sistema nervoso, non sviluppando ramificazioni come i neuroni esse occupano solo il 50% dello spazio nel SNC. Ne esistono varie tipologie con funzioni differenti: nel sistema nervoso centrale si trovano astrociti, oligodendrociti, microglia e cellule ependimali; nel sistema nervoso periferico si trovano cellule satelliti e cellule di Schwann. Le cellule gliali non generano né conducono impulsi nervosi, si occupano di dare supporto fisico e metabolico ai neuroni oltre che a costituire una protezione per il sistema nervoso centrale come nel caso della barriera ematoencefalica formata dagli astrociti [2].

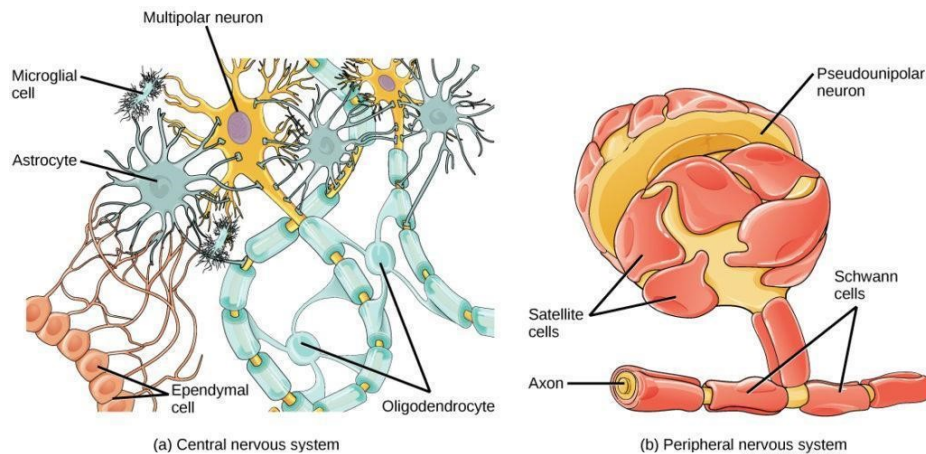


Figura 7. Illustrazione dei tipi di cellule gliali.

2.3 Segnali prodotti e trasmessi

I segnali che percorrono il sistema nervoso sono di natura elettrica e chimica. Per segnali di natura chimica si intende lo scambio di neurotrasmettitori tra neuroni o tra neurone e organo target, al fine della conduzione tali segnali vengono comunque tradotti in impulsi elettrici nervosi per mezzo dello scambio di neurotrasmettitori che legano specifici complessi di recettori e messengeri.

Un impulso nervoso consiste nella variazione transitoria del potenziale elettrico di membrana del neurone, ovvero della differenza di potenziale tra ambiente intracellulare e ambiente extracellulare. Il potenziale è dovuto ad una differenza di concentrazione degli ioni presenti nel liquido extracellulare e nel liquido intracellulare, oltre che ad una permeabilità selettiva della membrana cellulare, la quale attraverso processi di trasporto attivi transmembrana mantiene il disequilibrio fisiologico. L'equazione di Goldman permette di calcolare il potenziale di membrana a riposo a partire dalla concentrazione degli ioni potassio (K^+), sodio (Na^+) e cloro (Cl^-), per un neurone è circa -70 mV [2].

Il segnale elettrico condotto dagli assoni prende il nome di potenziale d'azione (figura 8), consiste in una rapida depolarizzazione con conseguente ripolarizzazione di tratti contigui della membrana cellulare assonica. È reso possibile dalla presenza sulla membrana di canali voltaggio dipendenti (Na^+ e K^+ principalmente), i quali al variare del potenziale di membrana cambiano la loro permeabilità allo ione specifico. I potenziali d'azione si propagano inalterati lungo l'assone poiché rigenerati costantemente nelle zone di membrana di volta in volta adiacenti oppure nei nodi di Ranvier, zone scoperte dall'isolamento mielinico e ricche di canali ionici. La conduzione è unidirezionale poiché il potenziale d'azione viene indotto sul segmento di membrana successivo quando il segmento da cui è scaturito si trova in periodo refrattario assoluto, ovvero i canali del sodio voltaggio dipendenti non hanno ancora completato il ciclo di attivazione. L'informazione è contenuta nella frequenza di sparo e non nell'ampiezza poiché il potenziale d'azione è un segnale *on-off*. Tale informazione viene trasferita alla cellula postsinaptica attraverso le sinapsi. Questo provoca un potenziale sul dendrite ricevente detto potenziale post-sinaptico, tale potenziale si propaga in maniera passiva fino al monticolo assonico dove viene integrato con i segnali provenienti dagli altri dendriti [2].

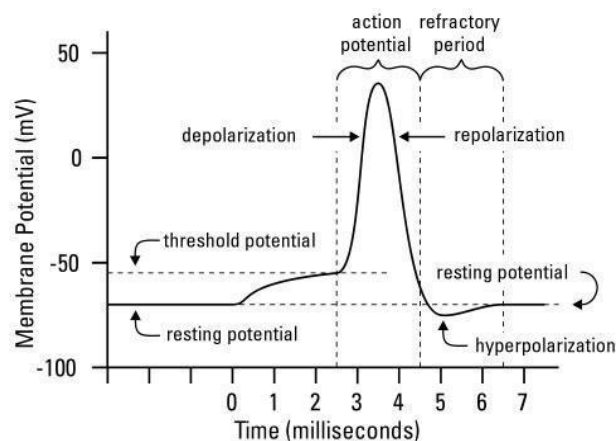


Figura 8. Ricostruzione di un potenziale d'azione.

3. Sistema visivo

Il sistema visivo permette la trasduzione delle radiazioni luminose in segnali nervosi che vengono integrati dalla corteccia visiva e da altre zone dell'encefalo al fine di creare la percezione delle immagini.

Il sistema visivo umano riesce a percepire solo parte dello spettro elettromagnetico (figura 9), in particolare le lunghezze d'onda dai 400nm ai 700nm, ovvero lo spettro di luce visibile [1].

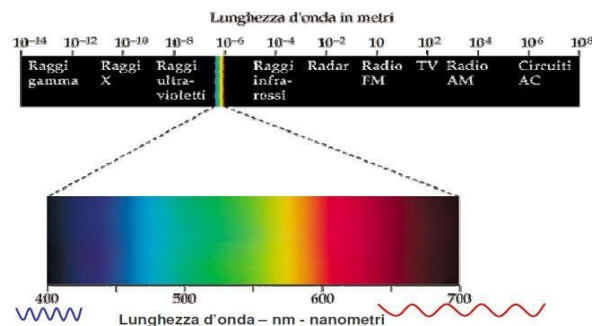


Figura 9. Lunghezze d'onda della luce visibile.

3.1 Anatomia

L'occhio (figura 10) è una struttura sferica riempita di liquido e circondata esternamente da uno strato di tessuto connettivo, detto sclera, che costituisce la parte bianca visibile dell'occhio. La sclera viene interrotta anteriormente dalla cornea, membrana trasparente attraverso la quale le radiazioni luminose entrano nel bulbo oculare, è composta da 6 diversi strati: film lacrimale, epitelio corneale, membrana di Bowman, stroma, membrana di Descemet ed endotelio corneale. Sotto la sclera vi è uno strato pigmentato ricco di melanina per evitare riflessione di luce detto coroide. La coroide nella parte posteriore dell'occhio è ricca di vasi sanguigni utili alla retina, mentre nella parte anteriore forma l'iride e i corpi ciliari. L'iride è un sottile strato di muscolo liscio pigmentato che regola la quantità di luce che attraversa la pupilla e quindi il cristallino. Il cristallino è una struttura cellulare trasparente la cui forma può essere controllata dai corpi ciliari e divide l'occhio interno in due cavità: la cavità anteriore è riempita da una sostanza acquosa detta umore acqueo la cui funzione è quella di trasportare i nutrienti dalla coroide alla cornea e al cristallino data la mancanza di vascolarizzazione di tali tessuti, tale sostanza è prodotta a livello della rete capillare dei corpi ciliari; la cavità posteriore, tra cristallino e retina, contiene una sostanza trasparente e gelatinosa detta umore vitreo (o corpo vitreo) che contribuisce al mantenimento della forma sferica del bulbo oculare. Lo strato più interno è

costituito dalla retina, complessa struttura di cellule sensoriali e cellule nervose che attuano la trasduzione delle radiazioni luminose in segnale nervoso [1-3].

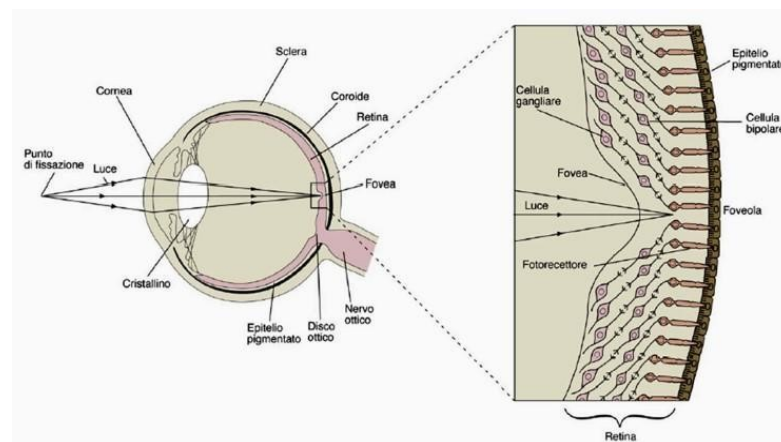


Figura 10. Anatomia del bulbo oculare [4].

I raggi luminosi vengono rifratti da cornea e cristallino per essere focalizzati in un punto preciso della retina detto Fovea. In particolare la cornea offre il maggiore contributo alla rifrazione per via della sua forma concava e della differenza di densità marcata tra aria e umore acqueo, la capacità rifrangente del cristallino varia sotto l'azione dei muscoli ciliari in base alla distanza dell'oggetto da mettere a fuoco. I muscoli ciliari formano un anello di muscolatura liscia attorno al cristallino, quando sono rilassati il cristallino risulta essere in trazione per mezzo del legamento sospensorio assumendo una forma più appiattita, viene quindi ridotto il potere rifrangente. Quando i muscoli ciliari sono contratti allentano la tensione sul legamento sospensorio, di conseguenza il cristallino, per proprietà elastiche intrinseche, assume una forma arrotondata con un maggiore potere rifrangente (figura 11). La capacità di modulare il potere di rifrazione del cristallino è detta accomodazione. Patologie come miopia e ipermetropia modificano la forma del bulbo oculare rispettivamente allontanando e avvicinando la fovea alla cornea, per limiti fisiologici di forma il cristallino non riesce a rifrangere correttamente le radiazioni luminose, è quindi necessario utilizzare delle lenti correttive con determinati valori di rifrazione [1].

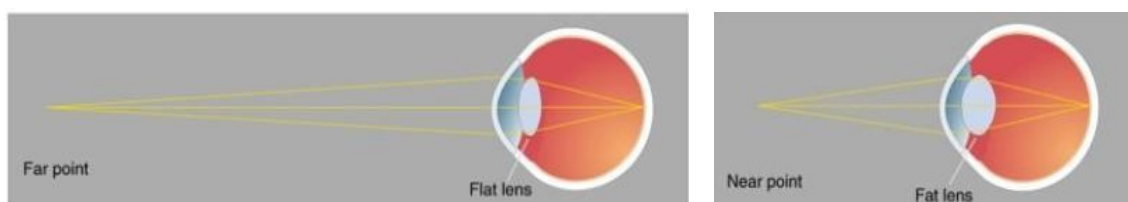


Figura 11. Accomodazione [5].

La retina (figura 12) è una vera e propria estensione del sistema nervoso centrale, con uno spessore variabile da 0.1mm a 0.23mm è composta da tre strati di cellule: uno strato esterno, vicino alla coroide, composto dalle cellule fotosensibili; uno strato intermedio composto da cellule bipolari e interneuroni; uno strato interno formato dalle cellule gangliari i cui assoni si raggruppano a formare il nervo ottico. Le radiazioni luminose vengono concentrate sulla fovea dove lo strato esterno di recettori ne è direttamente esposto, ciò permette una maggiore acuità visiva, in questa zona infatti le cellule gangliari e bipolari sono spostate lateralmente. La fovea è situata al centro della macula lutea, zona ricca di recettori ma con una acuità visiva minore della fovea per via della presenza degli strati interni della retina [1-3].

Per acuità visiva si intende la capacità dell'occhio di distinguere due punti vicini ed è determinata dalla spaziatura tra i recettori della retina e dalla precisione della rifrazione [1].

Lo strato esterno della retina è popolato da due categorie di fotorecettori: coni e bastoncelli (figura 13). Entrambe i recettori sono caratterizzati da un segmento esterno, che rileva lo stimolo luminoso, un segmento interno, che contiene l'apparato metabolico della cellula, e delle terminazioni sinaptiche rivolte alle cellule bipolari. I coni sono circa 4 milioni per retina e sono concentrati nella zona della fovea, sono adibiti alla visione fotopica, ovvero alla visione diurna, infatti necessitano di una stimolazione relativamente intensa per attivare le vie di trasduzione e permettono la ricezione del colore. I bastoncelli sono circa 100 milioni per retina e popolano le aree esterne alla fovea, sono adibiti alla visione scotopica, ovvero alla visione con poca luce, infatti possono essere stimolati anche da una bassa intensità luminosa. Le due tipologie di recettori si differenziano anche in base alla loro risoluzione temporale: i bastoncelli sono caratterizzati da una bassa risoluzione temporale, presentano una risposta lenta e sono più sensibili alla luce diffusa; al contrario i coni sono caratterizzati da un'alta risoluzione temporale, presentano una risposta rapida e sono più sensibili alla luce puntuale diretta [6].

Ogni fotorecettore è connesso ad una cellula bipolare. Nella fovea ogni cellula bipolare è connessa ad una cellula gangliare mentre in periferia una cellula gangliare può essere connessa a più cellule bipolari (figura 14). La retina è popolata da altri due tipi di cellule: cellule orizzontali, che comunicano con i fotorecettori e le cellule bipolari, e cellule amacrine, che comunicano con le cellule bipolari e le cellule gangliari [3].

Non tutta la retina è popolata dai recettori. Il nervo ottico e i vasi sanguigni emergono da una zona della retina detta disco ottico (o punto cieco), in questa zona non vi è alcuna presenza di fotorecettori. le vie di elaborazione superiori riescono a ricostruire l'immagine intera, ma è possibile individuare il punto cieco utilizzando la figura 15 [3].

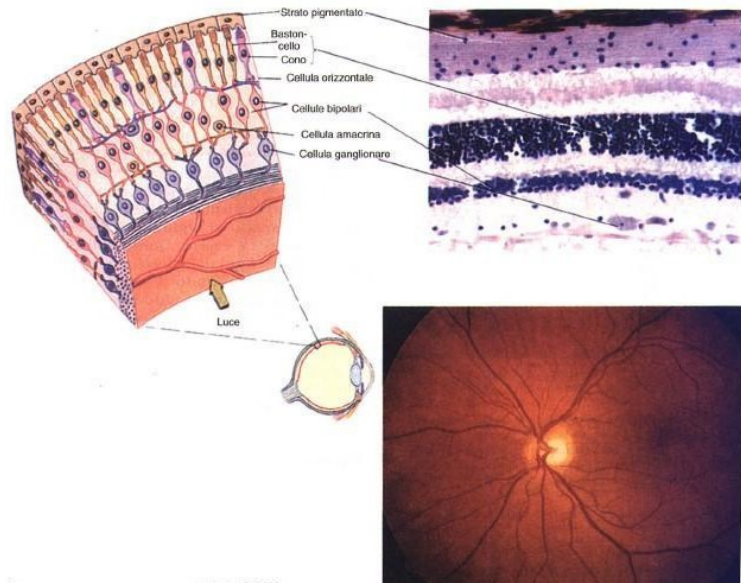


Figura 12. Organizzazione cellulare della retina – fotografia retinica scattata attraverso la pupilla [4].

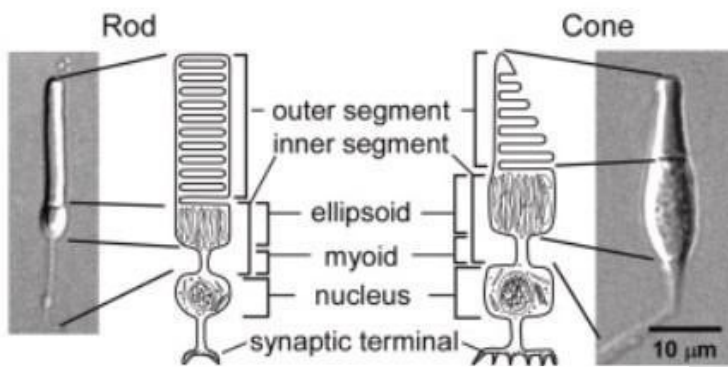


Figura 13. Struttura bastoncelli e coni [6].

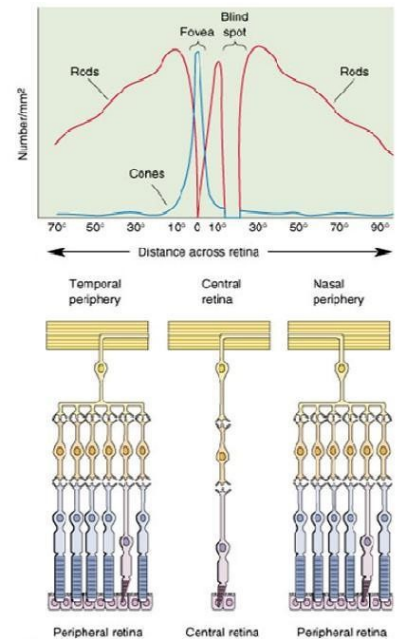


Figura 14. Distribuzione coni e bastoncelli [5].



Figura 15. Individuazione del punto cieco: con il solo occhio sinistro aperto si fissa il + ad una distanza di pochi centimetri, allontanandosi lentamente la macchia blu non viene più percepita poiché proiettata sul punto cieco dell'occhio sinistro [5].

Il segmento esterno dei fotorecettori è formato da dischi membranosi impilati che contengono pigmenti sensibili alla luce. I fotopigmenti sono costituiti da due componenti legati: l'opsina, proteina transmembrana dei dischi membranosi, e il retinale, un derivato della vitamina A che assorbe la luce. In condizioni di assenza di luce l'opsina non è attiva e il recettore si trova in condizioni di riposo. Al contrario delle altre cellule eccitabili, i fotorecettori presentano i canali del Na^+ aperti, ciò consente un flusso entrante di Na^+ che determina la depolarizzazione della membrana del recettore, quindi l'apertura dei canali del Ca^{2+} che stimola l'esocitosi di neurotrasmettitore (glutammato). Tale fenomeno prende il nome di "corrente di buio". Quando le radiazioni luminose colpiscono il retinale quest'ultimo cambia conformazione, passando da 11-cis- a trans-, attivando l'opsina e determinando la chiusura dei canali del Na^+ . La mancanza di corrente depolarizzante provoca una iperpolarizzazione della membrana del recettore. Il segnale di iperpolarizzazione è graduale a seconda dell'intensità di luce e si propaga in modo passivo fino alle terminazioni sinaptiche del fotorecettore, viene quindi inibito il rilascio di neurotrasmettitore per mezzo della chiusura dei canali del Ca^{2+} . Una volta che il segnale viene trasferito alla cellula bipolare il complesso opsina-retinale viene rigenerato e risulta pronto per un altro ciclo [3-6].

Sia coni che bastoncelli presentano lo stesso meccanismo di trasduzione, ma mentre i bastoncelli garantiscono una visione a bassa risoluzione e in scala di grigi, i coni permettono una visione ad alta risoluzione e a colori grazie ai differenti fotopigmenti che li caratterizzano in coni blu, coni rossi e coni verdi. I bastoncelli sono sensibili a un ampio spettro di lunghezze d'onda, mentre i coni rispondono selettivamente ad una certa porzione dello spettro visibile (figura 16). Le vie di elaborazione superiore riescono a distinguere i segnali provenienti dai tre tipi di coni così da provocare la percezione del colore, ma non riescono a discriminare le diverse lunghezze d'onda quando il segnale deriva dai bastoncelli dato che la rodopsina (opsina dei bastoncelli) reagisce allo stesso modo alle varie lunghezze d'onda [1].

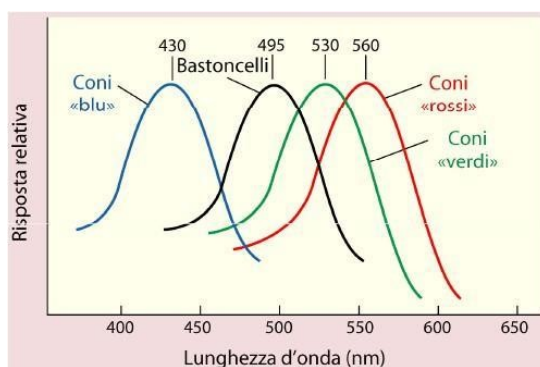


Figura 16. Sensibilità delle opsine alle lunghezze d'onda: Tritanopia (blu), Deuteranopia (verde), Protanopia (rosso).

Le cellule bipolari generano potenziali graduati in base alla quantità di neurotrasmettitore liberato dal fotorecettore, esistono principalmente due tipologie: cellule *on* e cellule *off*. Le cellule *on* subiscono depolarizzazione al calare della quantità di glutammato, ovvero all'esposizione alla luce, e iperpolarizzazione al crescere del quantitativo di neurotrasmettitore, ovvero al buio. Le cellule *off* subiscono iperpolarizzazione in risposta all'esposizione luminosa e depolarizzazione al buio. La differenza di risposta dipende dal recettore che lega il glutammato, nelle cellule bipolari *on* il recettore mGluR6 determina iperpolarizzazione e nelle cellule bipolari *off* il recettore AMPA determina depolarizzazione [1-7].

Le cellule gangliari ricevono i segnali dalle cellule bipolari integrandoli, se il segnale integrato supera la soglia di attivazione vengono generati i potenziali d'azione diretti al sistema nervoso centrale [1].

Ogni cellula bipolare riceve afferenze da un numero variabile di fotorecettori grazie alle interazioni delle cellule orizzontali, questo determina un campo recettivo, ovvero un'area della retina che stimolata dalla luce produce una modifica del potenziale di membrana della cellula bipolare. Anche le cellule gangliari presentano un campo ricettivo analogo per la presenza delle cellule amacrine. Tale rete di connessioni (figura 17) contribuisce alla creazione di campi visivi gangliari caratterizzati da un centro e una periferia che provocano stimoli contrari, si distinguono in centro *on* e centro *off*. Nel caso delle cellule gangliari centro *on* se l'illuminazione del campo recettivo è uniforme il segnale si annulla, come nel caso di oscuramento uniforme. Se l'illuminazione è prevalentemente centrale la cellula si depolarizza generando potenziali d'azione (figure 18-19). Nel caso di cellule gangliari centro *off* accade l'esatto opposto (figura 18). Questo sistema garantisce maggiore sensibilità al contrasto, ovvero alla variazione di luminosità locale, piuttosto che all'intensità assoluta della luce [4].

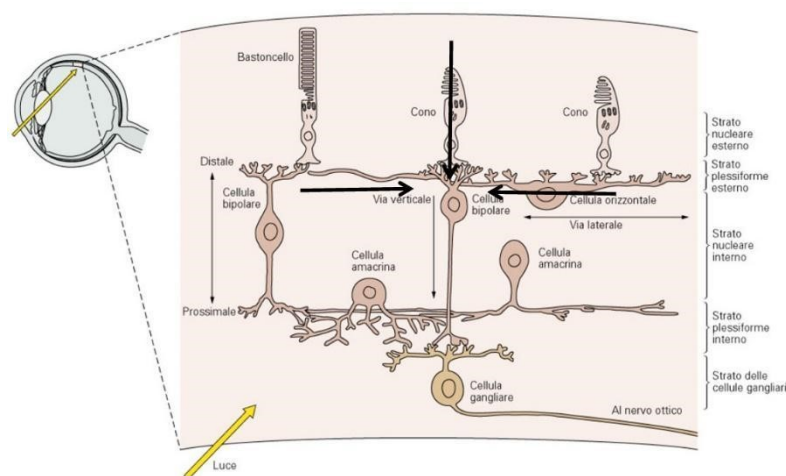


Figura 17. Illustrazione delle connessioni tra le cellule retiniche [4].

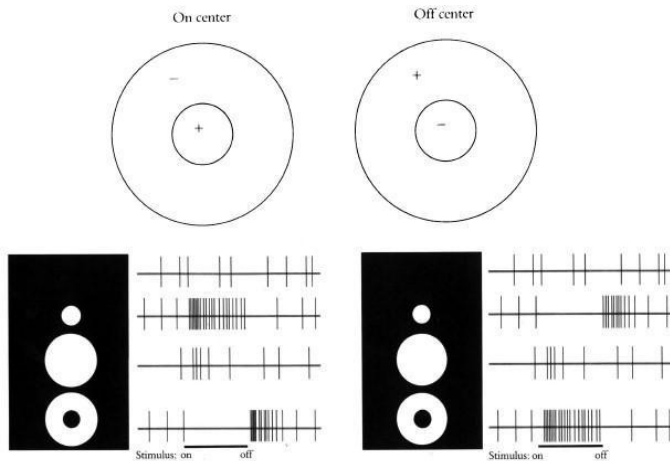


Figura 18. Risposta del campo ricettivo centro *on* e centro *off* [4].

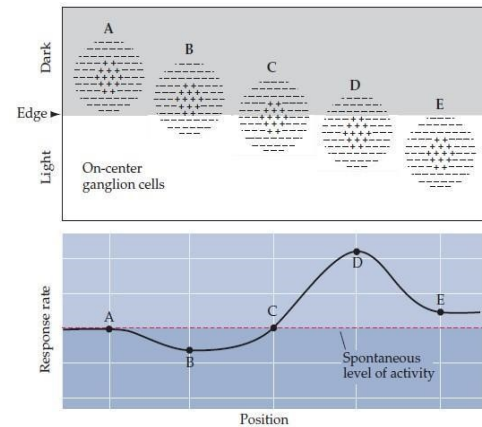


Figura 19. Risposta progressiva cellula gangliare centro *on*.

Per garantire una migliore sensibilità al contrasto viene attuato un processo di adattamento alla luce che coinvolge i riflessi pupillari. In caso di sovraesposizione il muscolo circolare interno dell'iride viene attivato dal sistema nervoso parasimpatico inducendo il restringimento della pupilla, inoltre la degradazione di fotopigmenti evita la saturazione del sistema sensoriale. Al contrario, in caso di scarsa illuminazione, l'attivazione del muscolo radiale esterno dell'iride da parte del sistema nervoso simpatico comporta la dilatazione della pupilla, parallelamente viene indotta la sintesi di fotopigmenti al fine di aumentare la sensibilità [1].

Le cellule gangliari si differenziano anche in base alla loro morfologia e fisiologia, si distinguono principalmente in cellule di tipo M (Magno) e cellule di tipo P (Parvo). Le cellule di tipo M (figura 20) sono di grandi dimensioni e hanno campi recettivi più ampi, sono più sensibili a stimoli con basso contrasto e la risposta alla stimolazione del centro del campo recettivo risulta transiente. Per queste caratteristiche si ipotizza che le cellule M siano adibite al riconoscimento del movimento. Le cellule di tipo P (figura 20) sono di più piccole dimensioni e costituiscono la maggior parte delle cellule gangliari, la stimolazione del centro del loro campo recettivo provoca delle risposte continue, inoltre sono sensibili a differenze nella lunghezza d'onda della luce, per questo prendono il nome di “cellule oppoenti ai colori”. Presentano un campo recettivo analogo al campo recettivo descritto precedentemente con la differenza che il centro e la periferia vengono attivati da specifiche lunghezze d'onda (figure 21-22) [5].

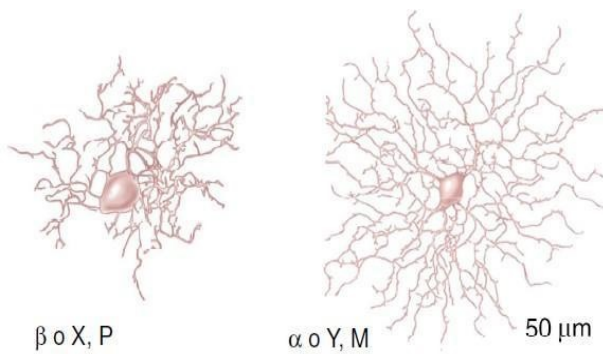


Figura 20. Campi ricettivi delle cellule gangliari P e M [5].

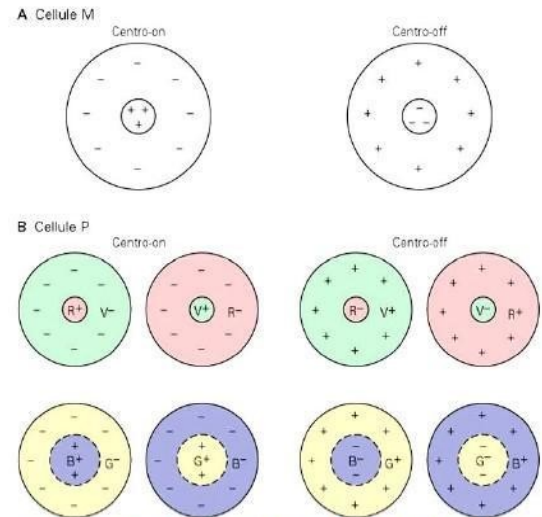


Figura 21. Campi ricettivi delle cellule gangliari P opponenti ai colori [5].

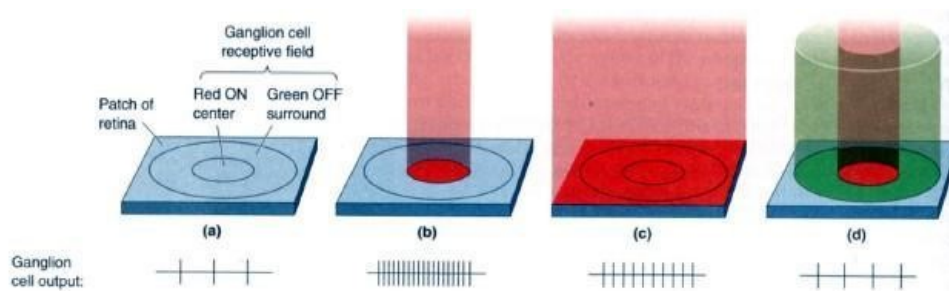


Figura 22. Attività di una cellula gangliare P opponente al colore centro on rosso [5].

Il campo visivo umano è formato dalla sovrapposizione dei campi visivi dei singoli occhi (campo visivo binoculare), data la conformazione dei collegamenti tra retina e corteccia visiva, la metà sinistra di entrambe le retine (nasale e temporale sinistra) proietta le informazioni solo sulla metà destra della corteccia visiva, allo stesso modo la metà destra di entrambe le retine (nasale e temporale destra) proietta il segnale solo sulla metà sinistra della corteccia visiva. La separazione dei nervi ottici avviene a livello del chiasmo ottico, localizzato sotto l'ipotalamo, i fasci di fibra nervosa riorganizzati che dipartono dal chiasmo ottico prendono il nome di tratti ottici. Grazie alla parziale decussazione il tratto ottico sinistro conduce i segnali prodotti dalla metà sinistra della retina di entrambi gli occhi, ovvero le informazioni riguardanti la metà destra del campo ottico, viceversa per il tratto ottico destro [1-3].

I tratti ottici giungono al corpo genicolato laterale corrispettivo, che è parte del talamo, il quale funge da stazione di smistamento dei segnali verso la corteccia visiva. Esso è ricco di cellule ganglionari M e P che presentano campi ricettivi analoghi alle cellule gangliari della retina [5].

Il segnale viene condotto attraverso fasci di fibre, chiamati radiazioni ottiche, dal corpo genicolato laterale alla corteccia visiva primaria situata nel lobo occipitale (figura 23). Nella corteccia visiva primaria viene mantenuto un ordine visuotopico preciso (figura 24), ma tale organizzazione si perde con la trasmissione e l'elaborazione del segnale da parte della corteccia visiva superiore [3-4].

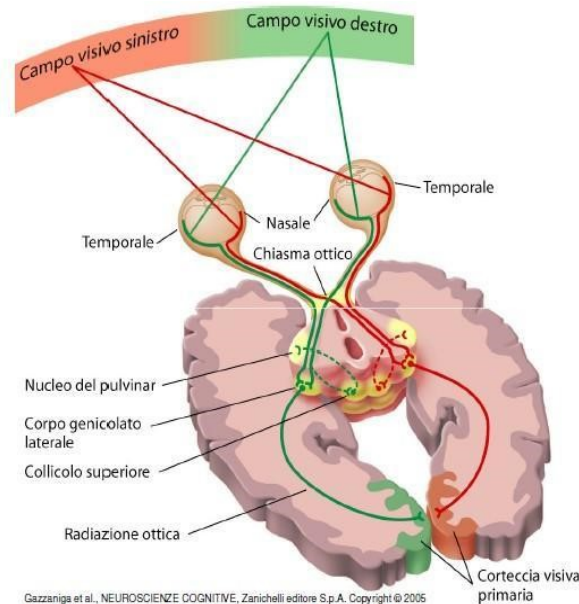


Figura 23. Percorso del segnale visivo

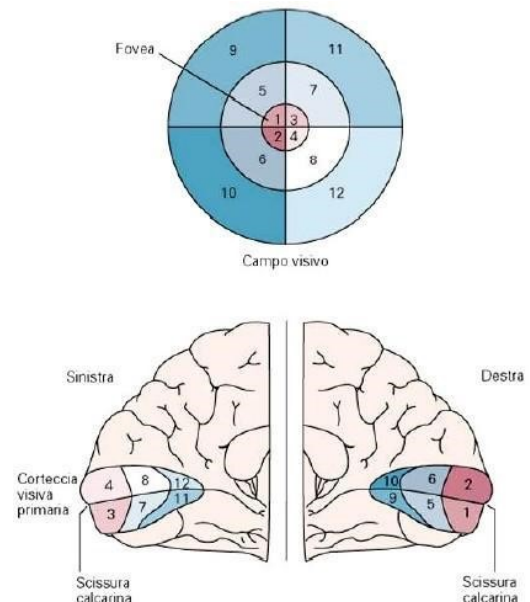


Figura 24. Ordine visuotopico della corteccia primaria [4].

3.3 Principali patologie

Varie patologie possono colpire il sistema visivo compromettendone le funzioni. Queste possono interessare l'occhio esterno e quindi la congiuntiva, la cornea e il cristallino, oppure il fondo e quindi retina e nervo ottico. le patologie del fondo possono essere diagnosticate attraverso metodi non invasivi come EOG, ERG, VEP e immagini retiniche.

La Cornea può essere affetta da patologie come la cheratite o il cheratocono. La prima consiste in un'infezione causata dall'evaporazione del film lacrimale, da traumi o da agenti virali. La seconda è invece una patologia progressiva che deforma la cornea facendole assumere una caratteristica forma a cono, il disturbo può essere trattato attraverso l'utilizzo di lenti a contatto rigide realizzate su misura [8].

La Cataratta è una patologia del cristallino molto frequente e in genere si manifesta con l'avanzare dell'età. Consiste in una crescente opacizzazione del cristallino e viene curata

chirurgicamente asportando il cristallino opaco e inserendo una lente artificiale. Ad oggi l'intervento si pratica in day surgery e solitamente ha un breve recupero [8].

Le distrofie retiniche congenite sono un gruppo eterogeneo di patologie a trasmissione genetica nei quali è presente una alterazione progressiva dello strato di fotorecettori e dell'epitelio pigmentato retinico. Appartengono a questo gruppo la Malattia di Best, la Retinite Pigmentosa e le patologie che interessano la macula come la distrofia dei coni o la degenerazione maculare legata all'invecchiamento [8].

La malattia di Best, nota anche come distrofia maculare vitelliforme, è una forma ereditaria di degenerazione maculare caratterizzata da perdita della visione centrale. Solitamente viene diagnosticata durante l'infanzia o l'adolescenza. Negli stadi iniziali una cisti color giallo si forma sotto l'epitelio pigmentato della retina, al di sotto della macula. L'acuità visiva può rimanere inalterata per molti anni. In molti individui la cisti può andare incontro a rottura e i depositi liquorali possono diffondere attraverso la macula e il sottostante epitelio pigmentato, ciò causa l'atrofia di tali tessuti con conseguente peggioramento della visione centrale [9].

La retinite pigmentosa è una patologia che appartiene a un gruppo di malattie ereditarie caratterizzate da degenerazione progressiva della retina di entrambi gli occhi. I fotorecettori della retina si deteriorano gradualmente a partire dai bastoncelli periferici, il progredire della malattia comporta una riduzione del campo visivo all'area centrale con perdita di visione notturna, sensibilità al contrasto e acuità visiva, negli stadi avanzati porta a cecità. Al momento non esiste una cura [8].

La retinopatia diabetica è una grave complicazione del diabete che colpisce la retina causando l'alterazione della microcircolazione sanguigna con conseguente morte delle cellule nervose e rischio di distacco di retina. Provoca delle zone di non visione su tutto il campo visivo. La probabilità che si verifichi tale patologia cresce se si è affetti da diabete da più tempo [8].

Il distacco di retina è la condizione per cui le cellule nervose si staccano dall'epitelio pigmentato e può essere causato da traumi o da fori retinici, ovvero dal deterioramento dei processi fisiologici di adesione. Tale condizione causa fotopsie, ovvero lampi di luce in assenza di sorgenti luminose, e miodesopsie, ovvero percezione di corpi mobili nel campo visivo, oltre che una diminuzione dello stesso. È possibile intervenire chirurgicamente per ristabilire lo stato di adesione [8-10].

Altre patologie interessano il nervo ottico e possono essere legate a diverse cause: diabete, glaucoma, patologie demielinizzanti (Sclerosi Multipla, neurite ottica), fenomeni ischemici, processi tossici, patologie autoimmuni (LES, Artrite reumatoide), patologie neurodegenerative

come il Parkinson, traumi. A seconda della localizzazione del processo neuritico, le patologie del nervo ottico possono essere anteriori, con tipiche modificazioni della testa del nervo ottico, o retrobulbari. Tali patologie si manifestano con la perdita progressiva o acuta dell'acuità visiva, riduzione del campo visivo e un'alterata percezione cromatica e dei contrasti [10].

Il glaucoma è una patologia che comporta un aumento della pressione intraoculare danneggiando permanentemente il nervo ottico e quindi riducendo il campo visivo. Si riconoscono principalmente il glaucoma primario ad angolo aperto, il glaucoma primario ad angolo stretto e il glaucoma secondario. Nel primo caso l'aumento di pressione intraoculare avviene in assenza di giustificanti alterazioni anatomiche macroscopiche. Lo sviluppo della patologia avviene lentamente e il soggetto non avverte sintomi fino a quando il nervo ottico non risulta gravemente danneggiato. Nel secondo caso la patologia si manifesta a causa della chiusura parziale o totale delle vie di drenaggio dell'umore acqueo, ciò provoca dolore e infiammazione dell'occhio con forte riduzione della vista. Nel terzo caso si riesce ad identificare una causa precisa come un trauma o problemi vascolari della retina spesso dovuti a diabete. Al fine di preservare la vista è essenziale una diagnosi precoce, tecniche come la tonografia, per la misurazione della pressione intraoculare, la tomografia a coerenza ottica (OCT) e l'esame del campo visivo sono utili a tale scopo. La terapia si basa su principi attivi capaci di riportare la pressione intraoculare a valori fisiologici [10].

Inoltre esistono varie tipologie di tumore che interessano l'occhio come i melanomi coroidali e congiuntivali, dati dalla proliferazione incontrollata (neoplasia) dei melanociti nelle rispettive membrane basali, o il retinoblastoma, dato da una neoplasia dei fotorecettori che comporta la formazione di una placca gelatinosa bianca (leucocoria) visibile dalla pupilla [10].

4. Metodi per la valutazione del sistema visivo

4.1 Elettroencefalogramma

L'elettroencefalogramma è una delle tecniche indirettamente utilizzate per valutare il sistema visivo. Infatti, l'analisi dei segnali generati dalle aree coinvolte nei processi visivi possono essere utili a individuare eventuali patologie delle vie visive corticali.

L'attività elettrica encefalica può essere rilevata dallo scalpo per mezzo di appositi elettrodi. Le correnti ioniche provocate dalle popolazioni di neuroni inducono cambiamenti di potenziale nel liquido extracellulare formando campi elettrici locali (local field potential LFP). Allo scalpo giunge una somma spaziale e temporale degli LFP generati nell'area sottostante agli elettrodi, inoltre il segnale subisce un'attenuazione da parte del liquido cerebro spinale, del cranio, della pelle e dell'encefalo stesso. Per questo motivo sono rilevabili solo attività elettriche postsinaptiche sincronizzate di un gran numero di neuroni corticali [11].

In particolare la corteccia è popolata da due principali classi di neuroni: neuroni piramidali e neuroni locali. A differenza dei neuroni locali, i neuroni piramidali popolano dal secondo al quarto strato corticale e presentano un dendrite apicale che si dirama sul primo strato corticale (quello più esterno) oltre che un lungo assone che proietta il segnale nervoso su altre zone dell'encefalo (figura 25). I neuroni piramidali sono caratterizzati da un'organizzazione spaziale ben definita, il loro orientamento circa perpendicolare rispetto alla superficie della corteccia permette la somma dei campi elettrici provocati dalle loro attività sinaptiche, possono essere schematizzati come dei dipoli elettrici (figura 26). L'attività dei neuroni locali e delle aree encefaliche più profonde non viene rilevata dal EEG poiché l'orientamento casuale dei neuroni provoca un annullamento dei segnali [11-12].

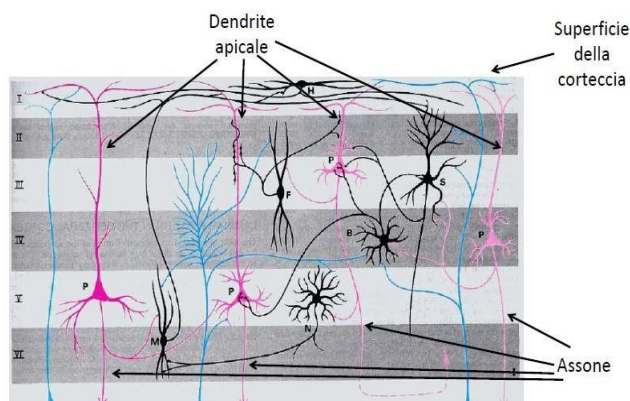


Figura 25. Schema della disposizione dei neuroni corticali [12].

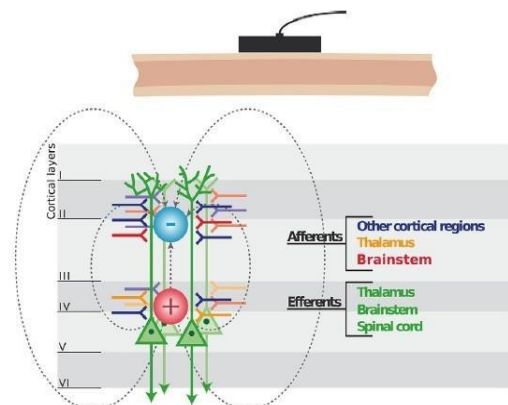


Figura 26. Dipolo elettrico risultante dall'attività dei neuroni piramidali corticali [12].

Il segnale EEG può essere classificato come segnale stocastico non stazionario, ovvero ha andamento casuale e non prevedibile oltre che dipendente dallo stato iniziale di osservazione. Per brevi tratti lo si può assumere stazionario. Si presenta come delle oscillazioni ad ampio spettro e si possono differenziare due tipologie di segnale: EEG spontaneo (o continuo) e potenziali evocati [11].

Il segnale EEG spontaneo è provocato dal normale funzionamento dell'encefalo ed è la principale causa del cambiamento del tracciato elettroencefalografico. Si possono riconoscere onde differenti in base alle frequenze e all'ampiezza, in ordine crescente di frequenza: Delta, Theta, Alpha, Beta, Gamma. Un'alta frequenza è indice di elevata attività cerebrale e comporta rilevazioni di ampiezza minore. Ad esempio le onde Delta sono caratterizzate da basse frequenze (1- 4Hz) e da un'ampiezza di decine di micro-Volt. Mentre le onde gamma sono oscillazioni ad alta frequenza (30-200Hz) con ampiezza intorno al micro-volt [11].

Il segnale EEG spontaneo si presenta come un grafico multicanale che riporta le oscillazioni rilevate dagli elettrodi (figura 27), da queste è possibile estrapolare una mappa topografica delle aree della corteccia maggiormente attive (figura 28) [12].

I potenziali evocati sono attività cerebrali transitorie provocate da particolari stimolazioni esterne e si presentano come un numero finito di onde la cui denominazione deriva dalla loro latenza. Sono caratterizzati da un'ampiezza molto inferiore all'ampiezza del EEG continuo e per estrarli vengono utilizzati algoritmi di media sulle rilevazioni ripetute del segnale. In base alla natura della stimolazione vengono classificati come visivi, cognitivi, motori e uditivi. Sono rilevanti in ambito clinico e di ricerca al fine di produrre diagnosi adeguate [11].

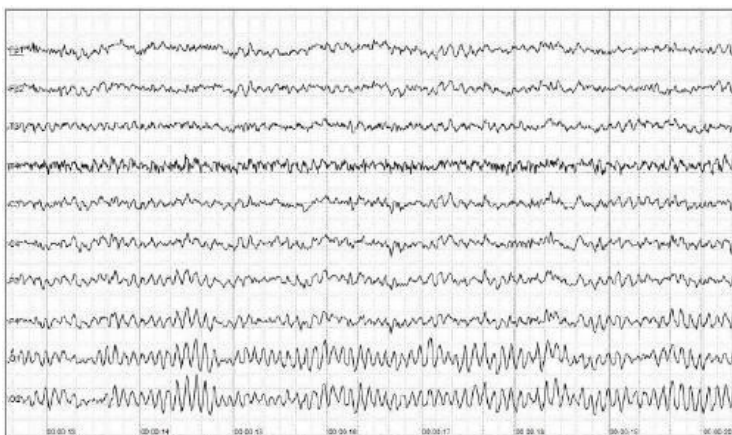


Figura 27. Esempio di EEG spontaneo [12].

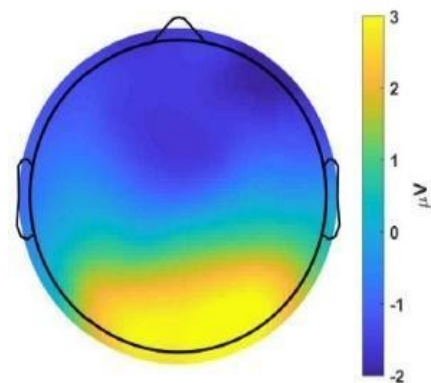


Figura 28. Esempio di mappa topografica dell'attività cerebrale [12].

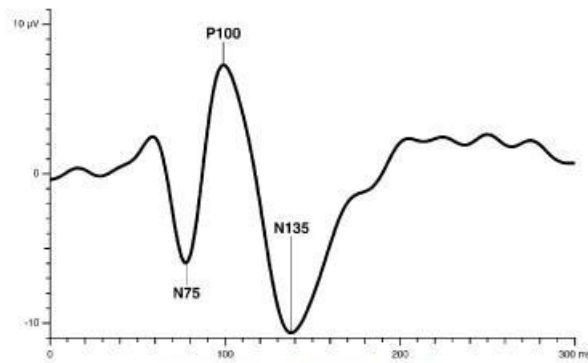


Figura 29. Tipico segnale evocato visivo.

L'elettroencefalogramma viene acquisito per mezzo di una serie di elettrodi posti sullo scalpo in posizioni standard. Il sistema 10-20 prevede 21 elettrodi posizionati come in figura 30, possono essere aggiunti altri elettrodi fino ad arrivare ad un sistema 10-5, che prevede oltre 300 elettrodi, per aumentare la risoluzione spaziale delle rilevazioni [11-12].

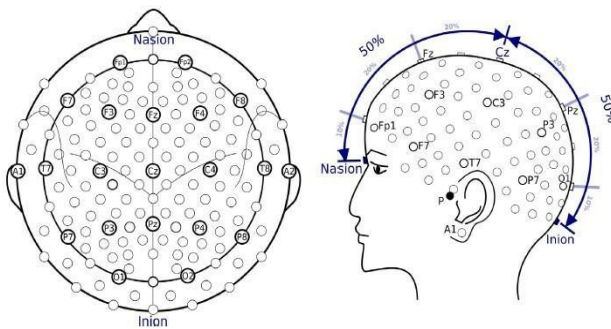


Figura 30. Disposizione degli elettrodi per EEG, gli elettrodi segnati formano la configurazione 10-20 espansibile fino alla 10-5 [11].



Figura 31. Cuffia per EEG.

La strumentazione di acquisizione moderna prevede una parte analogica costituita dalla catena elettrodi-amplificatori-filtri, e una parte digitale per la memorizzazione e l'elaborazione del segnale [12].

Gli elettrodi sono realizzati principalmente con tecnologia a cloruro di argento e si differenziano in attivi e passivi, a seconda che abbiano o meno integrato uno stadio di pre-amplificazione, e in base al mezzo conduttivo che viene utilizzato per l'applicazione sullo scalpo. Esistono elettrodi per applicazione tramite gel, nel caso di elettrodi passivi è richiesta l'abrasione dello strato superficiale della cute; elettrodi applicabili tramite tessuto imbevuto in acqua o soluzioni saline. Gli elettrodi applicabili a secco sono costituiti da pin di metallo posti direttamente a contatto con la cute, sono molto soggetti a rumore dato dal movimento. Gli elettrodi ad ago ipodermici vengono utilizzati per misurazioni precise, ma risultano invasivi [11].

Un circuito apposito regola le impedenze di elettrodo affinché non siano né diverse tra loro né troppo elevate, questo per evitare disturbi di tipo differenziale e riduzioni eccessive dell'ampiezza del segnale utile [12].

Il segnale può essere acquisito in configurazione differenziale o in configurazione monopolare. La configurazione differenziale prevede la misurazione della differenza di potenziale tra due elettrodi dello scalpo utilizzandone uno come riferimento di terra. La configurazione unipolare consiste nel misurare la differenza di potenziale presente tra un singolo elettrodo e il potenziale di riferimento, che spesso è dato dalla media dei potenziali degli elettrodi. Anche in questo caso un elettrodo viene utilizzato come riferimento di terra [12].

Il segnale utile in entrambe le configurazioni è di tipo differenziale e a livello dell'amplificazione viene utilizzato un accoppiamento AC per aumentare la reiezione di modo comune. Prima che il segnale venga convertito da analogico a digitale, viene posto un filtro anti-aliasing per limitarne la banda in frequenza [12].

Il segnale digitale può essere memorizzato, elaborato al fine di estrapolare informazioni e mostrato a monitor [12].

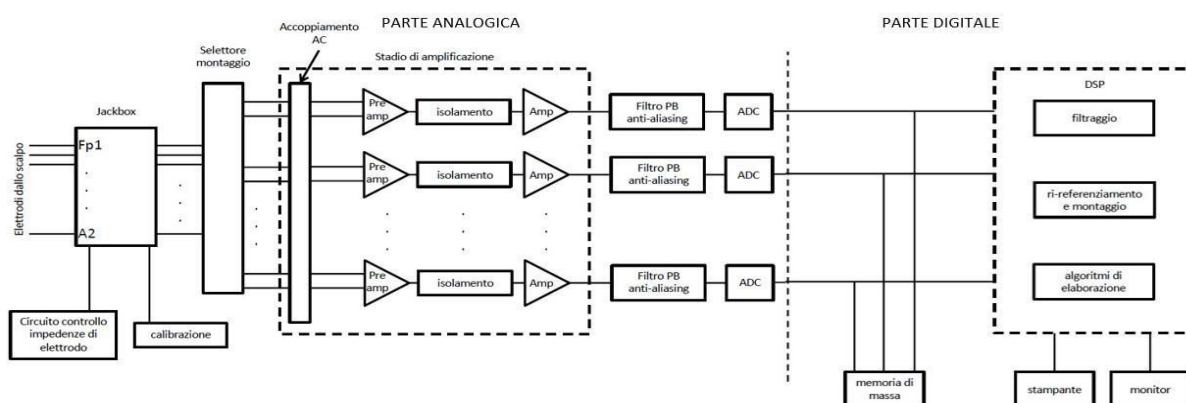


Figura 32. Schema della catena di acquisizione del segnale EEG [12].

4.2 Potenziali evocati visivi

I potenziali evocati visivi sono segnali elettrofisiologici estratti dall'elettroencefalogramma della corteccia visiva, sono utili ad indagare l'integrità funzionale della visione a tutti i livelli di integrazione (retina, nervo ottico, radiazioni ottiche, corteccia occipitale). La precisa origine fisiologica delle parti che compongono il segnale è ancora indefinita [13-14].

Sono stati notati per la prima volta nel 1934 da E. Adrian e B. Matthews come delle variazioni del potenziale EEG del lobo occipitale in seguito a stimoli luminosi. Nel 1951 è stato creato il

primo computer capace di estrarre i potenziali evocati con il metodo della media di epoche di acquisizione [14].

Per la rilevazione viene utilizzato il sistema 10-20, un elettrodo attivo (Oz) è posto sullo scalpo sopra la corteccia visiva, mentre l'elettrodo di riferimento (Fz) è connesso sulla parte frontale superiore, altri elettrodi attivi (O1, O2, PO7, PO8) sono posizionati in modo simmetrico sulla zona occipitale (figura 32) [15].

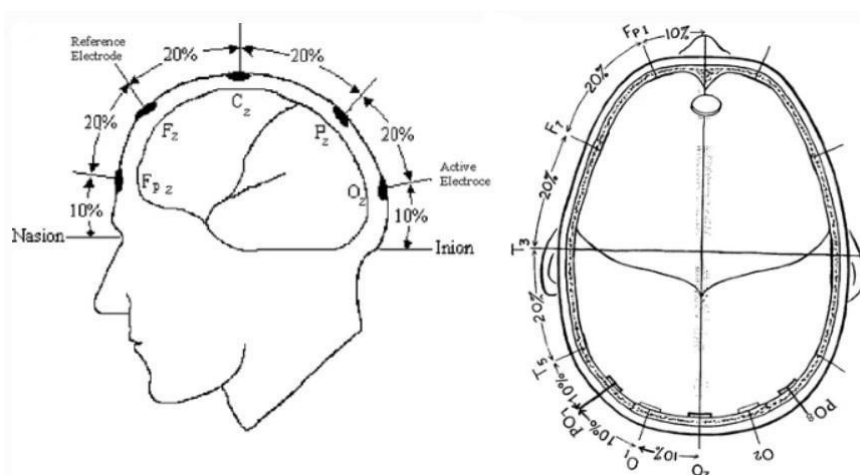


Figura 32. Posizione degli elettrodi per l'acquisizione dei VEP [21].

Esistono due principali classi di stimolazioni per i VEP transitori: *pattern* e *flash*. Entrambe le tipologie sono caratterizzate da una serie di onde tipiche [13].

Pattern-reversal: viene utilizzata una stimolazione analoga alla stimolazione per pERG, la scacchiera inverte il contrasto $2 (\pm 0.2)$ volte al secondo (circa 1Hz). L'onda P100 (figura 33) in particolare presenta piccole variazioni tra stimolazioni ripetute e risposta interoculare sullo stesso soggetto oltre che su soggetti diversi. Il tempo di picco dell'onda P100 è condizionato da vari aspetti non patologici come la grandezza del pattern utilizzato, il contrasto, la luminanza media, il filtraggio del segnale, l'età del paziente e la dilatazione pupillare [13].

Pattern onset/offset: la stimolazione consiste nel mostrare la scacchiera ad alto contrasto per 200ms e quindi mostrare immediatamente una schermata grigia di intensità pari all'intensità media della scacchiera per 400ms. La temporizzazione degli stimoli è fondamentale per discriminare la risposta *onset* (scacchiera) dalla risposta *offset* (schermata grigia). Viene utilizzato soprattutto in soggetti che presentano problemi di fissazione, come nel caso di nistagmo, in quanto tale tecnica è poco sensibile ad artefatti da movimento (figura 34) [13].

Flash: lo stimolo è un breve *flash* (meno di 5ms) che interessa almeno 20° del campo visivo, analogamente al ffERG la forza dello stimolo luminoso è di circa 3 photo cd*s/m², lo stimolo è presentato con una frequenza di 1Hz. Tale segnale presenta una maggiore variabilità tra soggetti diversi e tra gli occhi dello stesso soggetto rispetto al *pattern* VEP, ma risulta utile nel caso in cui il paziente non sia in grado di eseguire i test relativi a quest'ultimo. Le componenti più consistenti e quindi rilevanti ai fini diagnostici sono N2 e P2 (figura 35) [13].

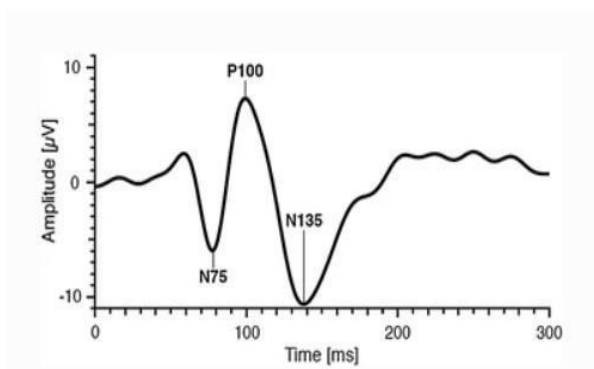


Figura 33. *Pattern-reversal* VEP [13].

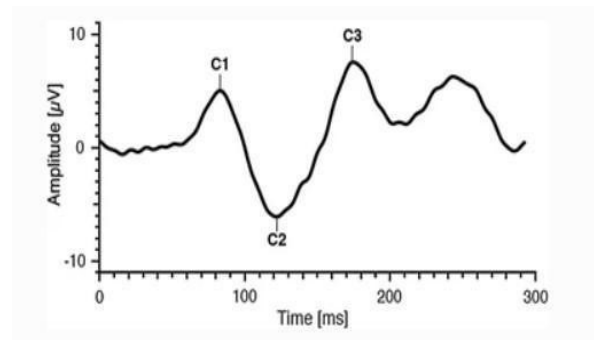


Figura 34. *Pattern onset/offset* VEP [13].

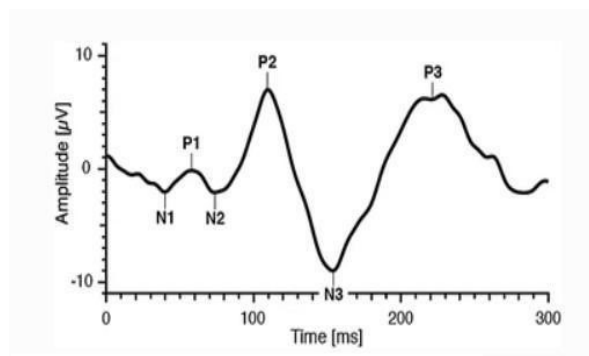


Figura 35. *Flash* VEP [13].

Multifocal VEP (mfVEP)

Attraverso un adattamento delle *m-sequence* del mfERG alla rilevazione dei potenziali evocati è possibile estrapolare la risposta data dalle sollecitazioni di porzioni discrete di retina per 48° di campo visivo (figura 36). L'analisi del segnale mfVEP permette di circoscrivere la zona della via di conduzione del segnale visivo responsabile della distorsione dei potenziali evocati, per esempio vie pre o post chiasmo ottico [13-14].

Lo stimolatore consiste in un pattern a bersaglio (figura 37), i settori sono di dimensioni maggiori con l'aumentare della distanza dal centro per garantire omogeneità di ampiezza dei segnali estratti considerando il fenomeno della magnificazione corticale, fenomeno per cui gli

stimoli che interessano il centro del campo visivo coinvolgono un numero maggiore di neuroni a livello della corteccia visiva. Ogni settore contiene un pattern a scacchiera, i vari settori invertono il contrasto secondo le *m-sequece* pseudocasuali [14].

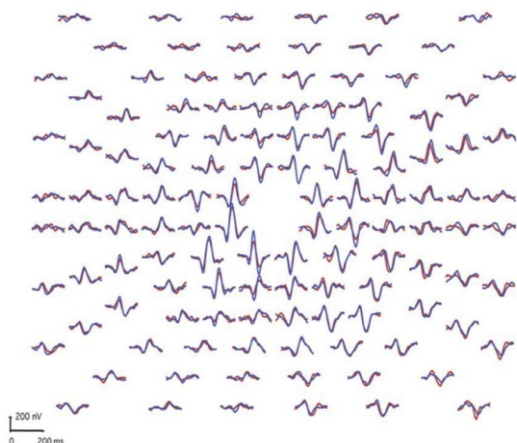


Figura 36. mfVEP media di 65 segnali non patologici, sono presenti le tracce per l'occhio destro (rosso) e per l'occhio sinistro (blu) [14].

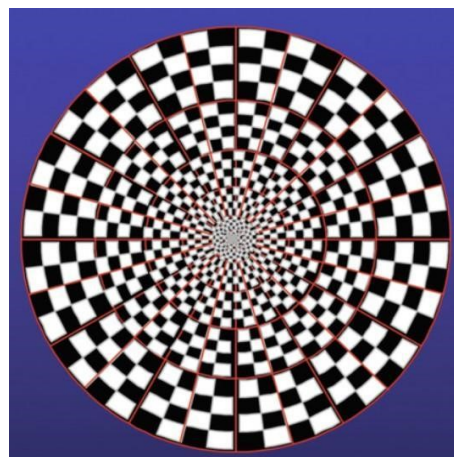


Figura 37. Pattern di stimolo mfVEP [14].

I segnali vengono acquisiti in banda da 1Hz a 100Hz con frequenza di campionamento di 1000Hz, eventuali filtri *notch* per la rimozione delle interferenze di rete sono sconsigliati. Perché il rapporto segnale rumore (SNR) sia ragionevole sono necessarie almeno 50 rilevazioni da mediare. Le epoche per i segnali *flash* e *pattern-revers* sono di 250ms, mentre per il segnale *pattern onset/offset* possono essere estese fino a 500ms. Per rilevazioni su soggetti di età inferiore a 1 anno le epoche superano i 500ms per tutte le tipologie di stimolo per via di una maggiore latenza di risposta, ovvero l'inizio della forma d'onda di risposta è ritardato [13]. A differenza delle rilevazioni ERG e EOG non devono essere somministrate al soggetto sostanze che inducono midriasi in quanto la pupilla deve essere in condizioni fisiologiche [13].

4.3 Elettrooculogramma

L'elettrooculogramma consiste nella misurazione indiretta della differenza di potenziale tra la membrana di Bruch, membrana isolante posta tra lo strato epiteliale pigmentato della retina e la corioide, e la cornea. Tale potenziale produce un dipolo elettrico orientato positivamente verso la cornea rispetto al retro del bulbo oculare, approssimativamente in direzione dello sguardo (figura 38). Il segnale EOG è prodotto dall'epitelio pigmentato della retina (transepithelial potential TEP), ma il normale tracciato dipende anche da un comportamento non patologico

delle altre componenti della retina, per questo può essere impiegato a fini diagnostici oltre che al monitoraggio dei movimenti oculari [9].

Il segnale è acquisito per mezzo di elettrodi cutanei di superficie posti alle estremità interna ed esterna dell'occhio (figura 39), in genere vengono utilizzati elettrodi argento-argento cloruro applicati con del gel per adattare l'impedenza (inferiore ai $5K\Omega$ tra i 20Hz e i 40Hz). Il movimento orizzontale del bulbo oculare in diverse condizioni di illuminazione causa variazioni del potenziale captato dagli elettrodi. Un elettrodo viene posto sulla fronte o sul lobo auricolare per garantire un potenziale di terra. Il segnale viene acquisito secondo degli standards forniti dal ISCEV (*International Society for Clinical Electrophysiology of Vision*) [9-15].

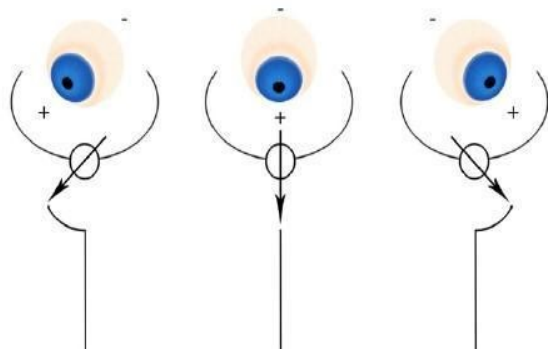


Figura 38. Rappresentazione del dipolo oculare [16].



Figura 39. Posizione degli elettrodi per EOG [9].

Per l'acquisizione viene utilizzato uno stimolatore che comprende tutto il campo visivo del soggetto e che garantisce illuminazione uniforme, è presente un poggiatesta per consentire al soggetto di mantenere la posizione con comodità. Sullo sfondo sono visibili due punti rossi di riferimento posizionati a 15° a sinistra e 15° a destra dal centro, abbastanza intensi per essere visibili sia nella fase di buio che in quella di luce (figura 40). Al soggetto viene chiesto di muovere gli occhi orizzontalmente tra i due punti di riferimento in varie condizioni di luce. Durante un primo periodo di illuminazione (10 minuti) il soggetto prova il movimento oculare e si adatta al livello di luminosità, seguono un secondo periodo di buio con i punti appena visibili (15 minuti) e un terzo periodo di luminosità (15 minuti con luminanza di 100cd/m^2 [nit]) [15]. Durante ciascun periodo viene prelevato un campione di segnale di 10 secondi ogni minuto, le oscillazioni presentano un'ampiezza dai $50\mu\text{V}$ ai $5000\mu\text{V}$ con componenti in frequenza da 0Hz ai 30Hz (figura 41). La frequenza di campionamento consigliata è superiore a 1KHz. In genere il segnale viene filtrato attraverso un passa alto a 0.1Hz o 0.05Hz per eliminare la presenza del *drift* di base, e un filtro passa basso dai 30Hz ai 35Hz per evitare rumori ad alta frequenza come le interferenze di rete (solitamente a 50Hz) [15-16].

Per ogni epoca di rilevazione viene calcolata la media dei valori di oscillazione. Durante la fase di buio il potenziale raggiunge il valore minimo “dark trough” (DT), mentre durante l’ultima fase di illuminazione il potenziale cresce (“light rise”) raggiungendo il suo picco “light peak” (LP). È possibile calcolare il rapporto LP:DT, inizialmente chiamato rapporto di Arden dal nome dello scienziato che implementò la prima applicazione clinica del EOC nel 1962 (figura 42). Un normale rapporto è di 2:1, viene considerato patologico se inferiore a 1.8:1 e 1.7:1 rispettivamente per età inferiore e superiore a 60 anni. Tale rapporto rappresenta un indice delle capacità funzionali dell’epitelio pigmentato, origine del potenziale [9-15].



Figura 40. Stimolatore per EOG [9].

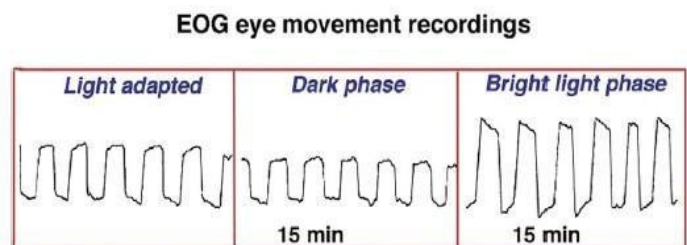


Figura 41. Oscillazioni tipiche EOG nelle diverse fasi [9].

È possibile notare come il tracciato del EOG venga distorto in caso di varie patologie, per questo viene utilizzato come strumento di conferma della diagnosi. Di seguito gli esempi nel caso di malattia di Best e retinite pigmentosa [9-17].

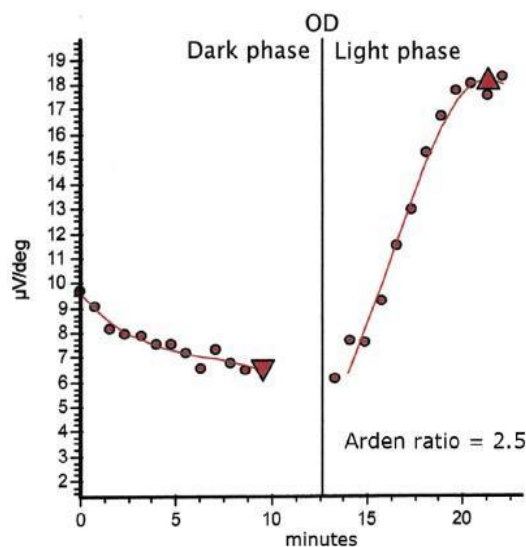


Figura 42. EOG non patologico [9].

La riduzione del rapporto LP:DT indica una disfunzione dell'epitelio pigmentato (figura 43), la malattia di Best (figura 44) non necessariamente compromette anche l'esame ERG [17].

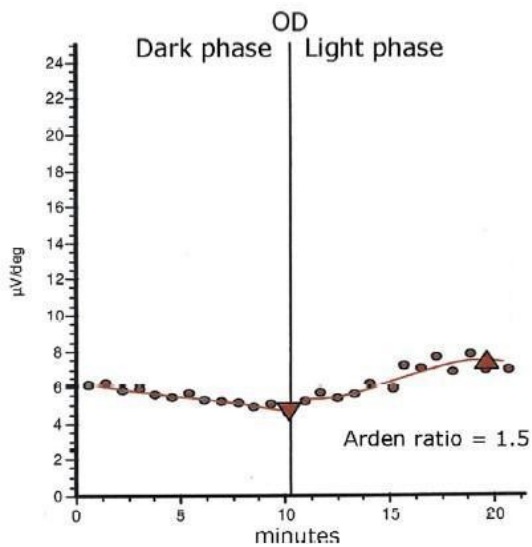


Figura 43. EOG patologico, malattia di Best [9].



Figura 44. Immagine retinica a colori con evidente cisti [9].

Nel caso di retinite pigmentosa avanzata il segnale EOG non è rilevabile (figura 45), ciò è dovuto al malfunzionamento dei bastoncelli (figura 46) [17].

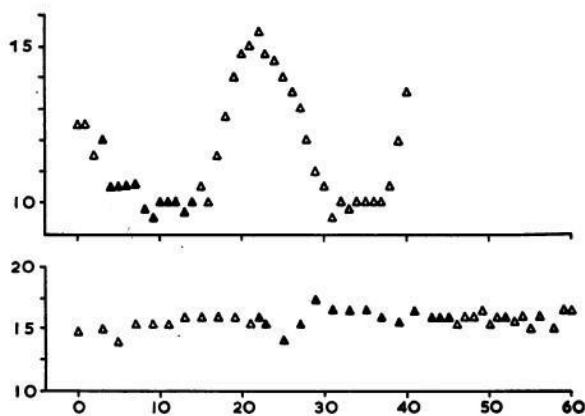


Figura 45. EOG patologico, retinite pigmentosa [17].



Figura 46. Immagine retinica a colori di una retina affetta da retinite pigmentosa.

Il segnale EOG può essere sfruttato per captare i movimenti oculari al fine di implementare dispositivi HCI (Human computer interface) utili a persone affette da patologie debilitanti o portatori di handicap che conservano la capacità di controllare il sistema oculomotorio. Esistono molteplici applicazioni che vanno dal captare la direzione generica del movimento oculare

attraverso elettrodi cardinali al riconoscimento della direzione dello sguardo. In particolare l'ultima applicazione sfrutta la relazione lineare tra segnale EOG e angolo di rotazione dello sguardo entro $\pm 30^\circ$, ovvero $20\mu\text{V}$ per grado circa (figura 47) [16].

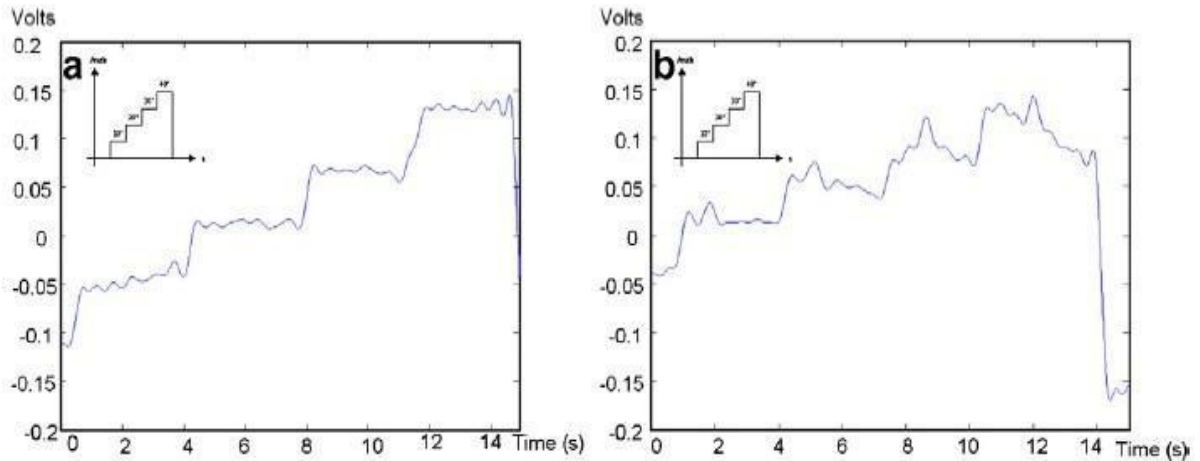


Figura 47. (a) Segnale di posizione EOG valido, (b) Segnale di posizione EOG corrotto da stanchezza e problemi di concentrazione [16].

I software che elaborano il segnale EOG devono poter discriminare i movimenti saccarici volontari (rapidi movimenti dell'occhio da un punto di fissazione ad un altro) dai movimenti involontari dovuti alla stanchezza e alla mancanza di concentrazione del soggetto. A tale scopo vengono utilizzati filtri derivativi con soglia o filtri CWT (*continuous wavelet transform*) [16].

La trasformata *wavelet* consiste in una trasformata di Fourier del segnale finestrato con una funzione che ha una data risoluzione temporale e una data risoluzione in frequenza. Per far sì che si possano individuare sia elementi a banda larga che elementi a banda puntuale (sinusoidi), si utilizza una funzione (*mother wavelet*) con banda variabile per avere una localizzazione in frequenza sempre adeguata. Se la banda del segnale aumenta allora aumenta l'intervallo di risoluzione in frequenza della *mother wavelet*. Le risoluzioni nel tempo e nella frequenza sono inversamente proporzionali. Per mezzo di particolari parametri la CWT permette di creare filtri derivativi più performanti riuscendo ad individuare anche i più piccoli spostamenti [16].

Una rete neurale istruita attraverso EOG tipici può essere applicata al fine di discriminare il segnale utile dal rumore dovuto ai movimenti involontari (figura 48). Tali tecnologie possono quindi interpretare i movimenti oculari al fine di produrre dei comandi (figura 49) [16].

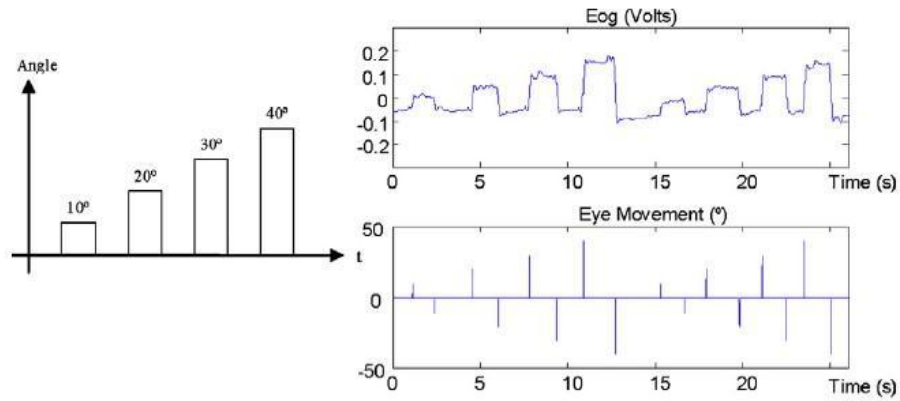


Figura 48. Ingresso e uscita della rete neurale per determinati movimenti oculari [16].

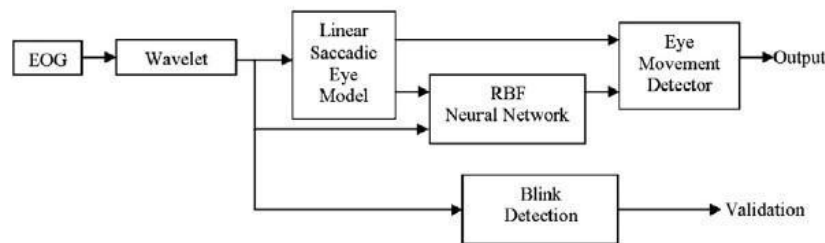


Figura 49. Catena di acquisizione del movimento oculare [16].

4.4 Elettroretinogramma

L'elettroretinogramma è utile ad indagare l'attività elettrica della retina in risposta a particolari stimoli luminosi, pertanto rappresenta una misura oggettiva delle funzioni retiniche e un efficace strumento di diagnosi. In particolare il segnale è prodotto dalla cooperazione dei fotorecettori e delle cellule gangliari. La prima rilevazione risale al 1865 su una retina di un anfibio ad opera dello scienziato svedese Alarik Frithiof Holmgren. Successivamente la tecnica è stata perfezionata fino all'introduzione di elettrodi su lente a contatto nel 1941 da parte dello scienziato americano Lorin Riggs. Gli studi alla base della comprensione odierna del ERG sono stati condotti dallo scienziato Ragnar Granit, questo gli valse il premio Nobel per la fisiologia e la medicina nel 1967 [18].

Per via della disposizione ordinata in parallelo dei fotorecettori, quando la retina è stimolata uniformemente viene indotta una corrente extracellulare risultante (figura 50). Tale corrente interessa un circuito interno alla retina (locale) e un circuito esterno (remoto) il quale permette la rilevazione del potenziale tramite elettrodi di superficie (figura 51) [19].

La differenza di potenziale tra i punti A e B risulta essere: $I_A R_1 = I_B (R_2 + R_3 + R_4 + R_5 + R_6)$

Essendo $R_1 < R_2 + R_3 + R_4 + R_5 + R_6$ le correnti risultano $I_A > I_B$.

I punti A e B rappresentano i capi del tessuto che genera il segnale, ma la rilevazione avviene all'esterno dell'occhio tra i punti C e D la cui differenza di potenziale risulta l'effettivo ERG:

$V_C - V_D = I_B R_4$ oppure $V_C - V_D = I_A R_1 - I_B (R_2 + R_3 + R_5 + R_6)$ [19].

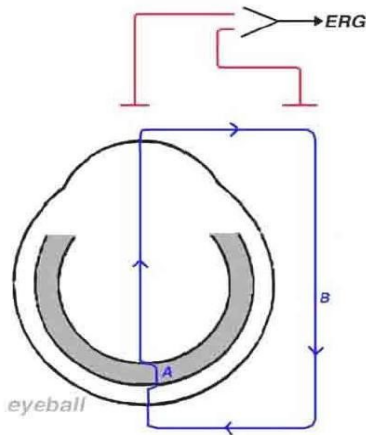


Figura 50. Rappresentazione schematica delle correnti extracellulari: (A) all'interno della retina, (B) circuito retina-vitreo-coroide-retina [19].

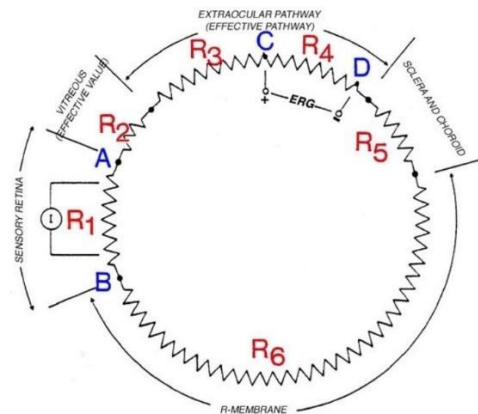


Figura 51. Circuito resistivo equivalente, I è la corrente generata dalla retina e può percorrere il percorso locale (R_1) e il percorso remoto ($R_2 + R_3 + R_4 + R_5 + R_6$), le dimensioni dei resistori sono proporzionali al valore di resistenza [19].

In seguito alla stimolazione uniforme del campo visivo tramite un apposito stimolatore (figura 52), la rilevazione del potenziale ERG avviene per mezzo di elettrodi attivi di superficie di vario genere. Per garantire la ripetibilità della misura gli elettrodi non possono essere troppo invasivi. Essi si suddividono in lenti a contatto, congiuntivali e cutanei [20].



Figura 52. Stimolatore Retimax per ERG (ganzfield).

Gli elettrodi a lente a contatto sono i più performanti, ma i più invasivi in quanto non permettono la chiusura dell'occhio. In genere viene utilizzata anestesia topica somministrata con un collirio e se necessario anche sedazione, inoltre viene applicata una sostanza ionica conduttiva (lacrime

artificiali) per prevenire irritazioni della cornea. Gli elettrodi Burian-Allen (figura 5), unipolari o bipolari con elettrodo di riferimento, possono essere riutilizzati e consistono in un anello di acciaio inossidabile montato su una lente di PMMA (polimetilmetacrilato). Un'alternativa è rappresentata dagli elettrodi Jet (figura 54), elettrodi monouso costituiti da un anello d'oro posto su una lente di plastica, sono più confortevoli dei Burian-Allen, ma possono staccarsi facilmente dalla cornea [20].



Figura 53. Elettrodo Burian-Allen [20].

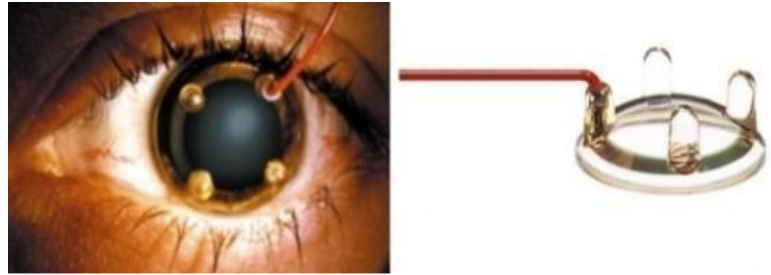


Figura 54. Elettrodo Jet [20].

Gli elettrodi congiuntivali sono più confortevoli in quanto permettono al paziente di chiudere gli occhi e non necessitano di anestesia topica. Gli elettrodi Dawson-Trick-Litzkow (DTL) sono costituiti da un filo di nylon rivestito in argento teso sulla sclera da due fissatori applicati alle estremità dell'occhio (figura 55). Gli elettrodi Mylar (figura 56) e Hawlina-Konec (figura 57) consistono in un filamento di materiale conduttivo rivestito in oro o argento che viene inserito nella sacca congiuntivale, non sono molto utilizzati [20].



Figura 55. Elettrodo DTL [20].



Figura 56. Elettrodo Mylar [20].

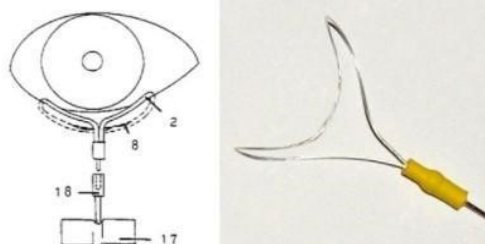


Figura 57. Elettrodo H-K [20].

Gli elettrodi cutanei sono i meno efficaci per via dell'alta e variabile resistenza elettrica offerta dal percorso di conduzione dalla retina all'elettrodo. È necessario preparare il sito di applicazione attraverso l'abrasione dello strato superficiale della cute. L'impedenza di elettrodo deve essere inferiore a $5K\Omega$ tra i 10Hz e i 100Hz. Risultano i più utilizzati in campo pediatrico per la bassa invasività [20].

L'elettrodo di riferimento, essenziale per l'acquisizione differenziale del potenziale, può essere posizionato sul lobo auricolare, mentre l'elettrodo di terra, che rappresenta lo zero relativo al segnale di modo comune, può essere applicato sul polso, sulla fronte o sulla sommità del capo, [20].

Esistono varie tipologie di segnale ERG: ffERG (*full field ERG*), mfERG (*multi focal ERG*) e pERG (*pattern ERG*). Il ISCEV fornisce gli standard da seguire per la rilevazione di tali segnali.

Full field ERG (ffERG)

Il *full field ERG* rappresenta l'attività elettrica globale della retina in risposta a stimoli luminosi in diverse condizioni di adattamento. È utile ad individuare patologie che interessano aree diffuse della retina permettendone la localizzazione negli strati interni o esterni, infatti non riesce ad individuare piccole lesioni locali [18].

Per garantire la massima sollecitazione della retina deve essere indotta la massima midriasi al soggetto in esame. Gli stimoli luminosi comprendono uniformemente tutto il campo visivo, hanno durata inferiore ai 5ms e sono acromatici. Le unità di misura utilizzate sono candela per metro quadro (cd/m^2) per la luminanza dello sfondo, e candele al secondo per metro quadro ($cd*s/m^2$) per la potenza per unità di superficie dello stimolo luminoso (*flash*). Gli stimoli vengono denominati in base allo stato di adattamento (*DA-dark LA-light*) e alla potenza dello stimolo in unità fotopiche ($photo\ cd*s/m^2$). Le unità fotopiche sono relative alla risposta prevalente dei coni, mentre le unità scotopiche sono relative alla risposta prevalente dei bastoncelli e corrispondono a circa 2.5 volte le unità fotopiche [18].

Il segnale viene acquisito con banda da 0.3Hz a 300Hz e risoluzione di almeno $1\mu V$, il campionamento avviene con frequenza di almeno 1KHz [18].

Al fine di acquisire il ffERG vi sono sei stimolazioni e risposte standard (figura 58).

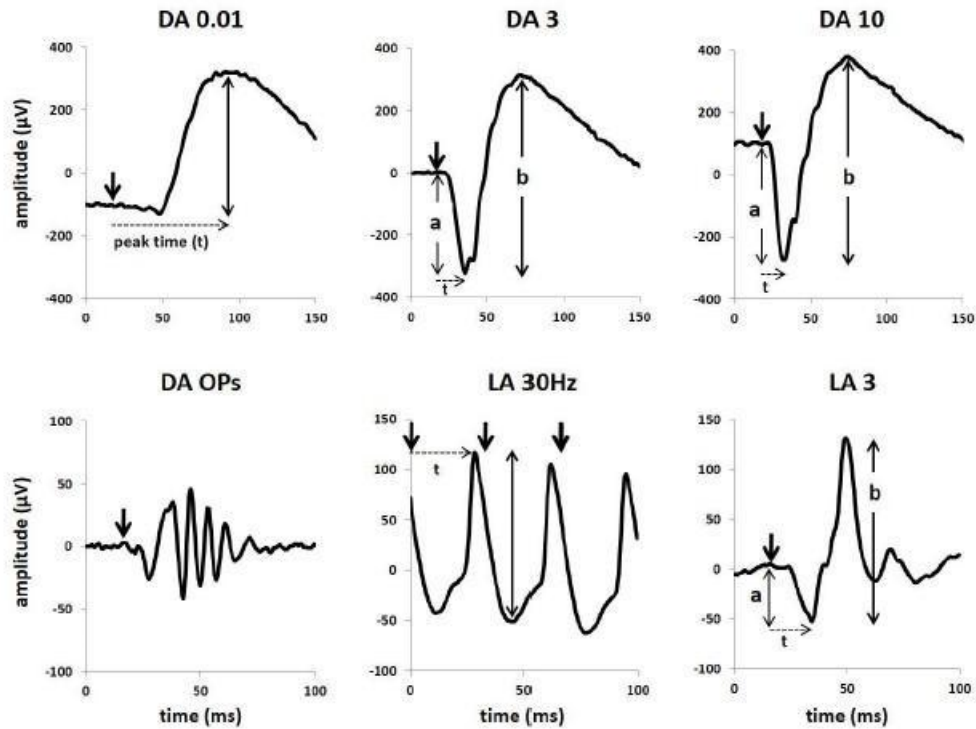


Figura 58. Risposte ffERG ai segnali standard [19].

Il segnale DA 0.01 è la risposta ad un debole *flash* diffuso ($0.01 \text{ photo cd*s/m}^2$) in condizioni di adattamento al buio. Si evidenzia un lento aumento del potenziale a formare la *b-wave*, tale onda è causata principalmente dall'attività elettrica delle cellule postsinaptiche ai fotorecettori, in particolare delle cellule bipolari *on* [18-19].

I segnali DA 3 e DA 10 sono le risposte ad un più forte *flash* diffuso (3 photo cd*s/m^2 e $10 \text{ photo cd*s/m}^2$) in condizioni di adattamento al buio. Inizialmente si rileva una rapida decrescita del potenziale corneale denominata *a-wave* dovuta all'attività combinata di coni e bastoncelli, in seguito si verifica una *b-wave* generata dalle cellule bipolari *on* e *off*. La crescita della *b-wave* è caratterizzata da dei potenziali oscillatori (OPs) tra i 100Hz e i 150Hz la cui origine è al momento incerta. Possono essere estratti (DA OPs) e analizzati tramite filtri digitali sfruttando la FFT (*fast Fourier transform*). La ridotta ampiezza oppure un'organizzazione temporale distorta dei OPs sono indice di problemi circolatori sanguigni nella retina [18-19].

Il segnale LA 3 viene registrato dopo un periodo di adattamento alla luce di 10 minuti (30 cd/m^2), è la risposta ad un flash di 3 photo cd*s/m^2 . La *a-wave* è generata dall'attività elettrica dei fotorecettori e delle cellule bipolari *off*, mentre la *b-wave* è determinata dalle cellule bipolari *on* e *off* [18-19].

Il segnale LA 30Hz è la risposta ad uno stimolo luminoso LA 3 intermittente con frequenza di 30Hz, è utile ad indagare la catena di trasduzione legata ai coni, infatti viene esclusa dal segnale utile la risposta transitoria dei bastoncelli. Ad ogni sollecitazione viene prodotta un'onda con un apice e un valore di fondo [18-19].

Le onde a e b sono caratterizzate da un'ampiezza di picco e un tempo di risposta (di volta in volta illustrati in figura 58). Con l'aumentare dell'intensità dello stimolo l'ampiezza delle onde aumenta mentre si riduce il tempo di risposta. Tali parametri forniscono informazioni confrontabili delle funzionalità della retina soprattutto in ambiente clinico dove gli stimoli e le condizioni di misura sono costanti [19].

Il segnale PhNR (*photopic negative response*) è rappresentato dalla lenta curva negativa che segue la *b-wave* in risposta ad un breve stimolo luminoso LA (figura 59). Tale potenziale è dovuto all'attività delle cellule gangliari retiniche, è infatti utilizzato per testare l'integrità degli stati interni della retina i quali possono essere compromessi da patologie come il glaucoma [21]. Diversamente dall'acquisizione del normale ffERG viene utilizzato uno stimolo luminoso cromatico, in particolare una stimolazione a lunghezza d'onda elevata (rosso 630-660nm, 1-2.5 photo cd*s/m²) su uno sfondo a lunghezza ridotta d'onda (blu 450-485nm, 10cd/m²) che porta in saturazione i coni, ciò permette di ottenere un PhNR di ampiezza maggiore rispetto alla stimolazione ad ampio spettro. L'ampiezza del PhNR può essere considerata dal picco dell'onda b al massimo picco negativo (PT) oppure dallo zero al massimo picco negativo (BT). Nei casi patologici in cui il picco negativo è difficilmente individuabile viene considerata l'ampiezza ad un dato istante dal momento dello stimolo (65-75ms) [21].

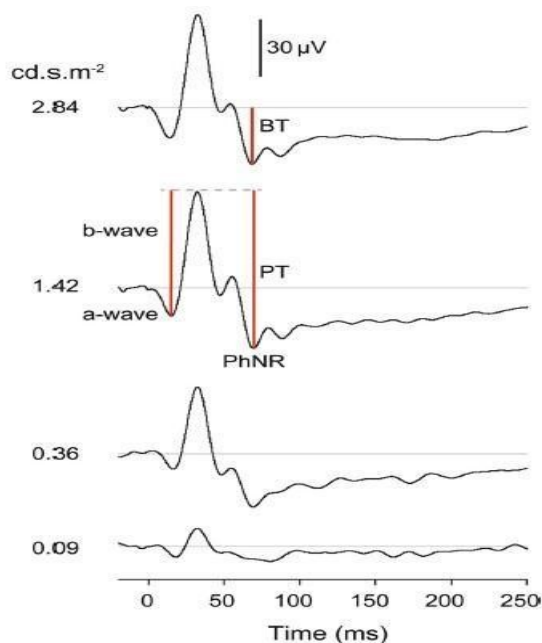


Figura 59. Risposte PhNR a diverse stimolazioni [21].

Al fine di ridurre il rumore è utile eseguire più rilevazioni (10-20) della risposta allo stesso stimolo e considerarne la media, per i segnali DA l'intervallo di stimolazione va dai 10 secondi (DA 0.01) ai 20 secondi (DA 3, DA 10), per i segnali LA l'intervallo è di circa 0.5 secondi [18-21].

Multi focal electroretinogram (mfERG)

L'elettroretinogramma multifocale permette di misurare la risposta della retina in seguito a stimolazioni simultanee di aree discrete, restituisce quindi una misura topografica dell'attività della retina. È principalmente utilizzato per individuare disfunzioni retiniche locali che interessano in particolare i coni e le cellule bipolari [18]. Lo stimolatore è composto da 61 o 103 esagoni i quali possono assumere due stati: *on* e *off* (figura 60). Gli esagoni cambiano di stato in maniera rapida e pseudocasuale in base a una *m-sequence*, la sequenza di cambiamento è uguale per ognuno di essi, ma con un diverso ritardo temporale [22].

La risposta locale non è estratta direttamente dalla risposta di una zona della retina, ma dal ERG continuo misurato dagli elettrodi standard sulla base di caratteristiche temporali. Il segnale in risposta ad una singola stimolazione è detto "*first order kernel*" (figure 61-62). Tale segnale può essere estratto considerando la risposta all'attivazione di tutti gli esagoni, incluso l'esagono in questione (curva R), e quindi sottraendo la risposta ottenuta dall'attivazione di tutti gli esagoni eccetto l'esagono da esaminare (curva NR). L'algoritmo di estrazione non esegue questi passaggi, ma sfrutta la cross-correlazione tra le *m-sequence* e i segnali ERG corrispondenti. Considerando le risposte relative ad una sequenza di impulsi dello stesso esagono è possibile derivare kernel di ordini superiori, tali procedure non sono utilizzate nelle applicazioni standard [22-23].

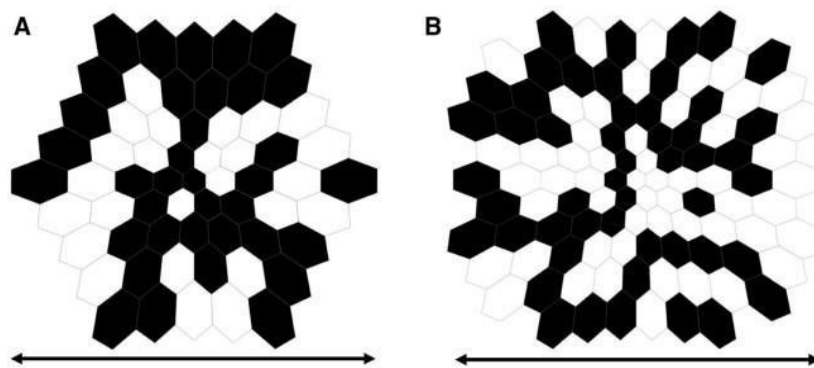


Figura 60. (A) Stimolatore a 61 elementi. (B) Stimolatore a 103 elementi [22].

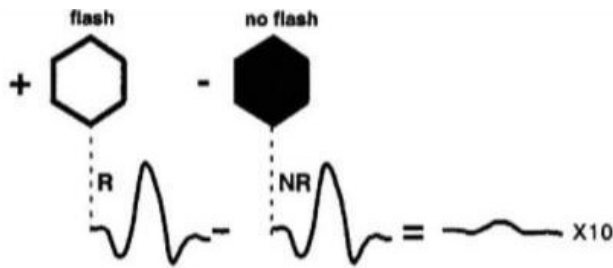


Figura 61. Illustrazione *first-order kernel* [23].

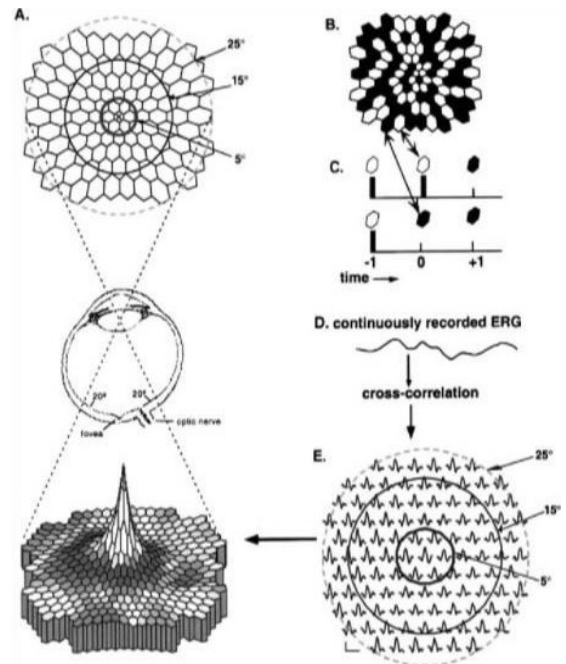


Figura 62. (A) Stimolatore, occhio schematizzato per indicare l'area di proiezione sulla retina, risposta 3D di un soggetto sano. (B) Istante di un mfERG. (C) Sequenza di stimolazione di sue settori. (D) ERG continuo captato dell'elettrodo. (E) *First-order kernel* estratti per correlazione tra C e D [23].

Il segnale mfERG è generato principalmente dall'attività dei coni e delle cellule bipolari *on* e *off*, è composto da tre componenti (N1, P1, N2) simili alle componenti del segnale ffERG (figura 63). Le differenze sono dovute al fatto che il segnale mfERG è un'estrazione matematica mentre il segnale ffERG è l'effettiva rilevazione della risposta retinica [22].

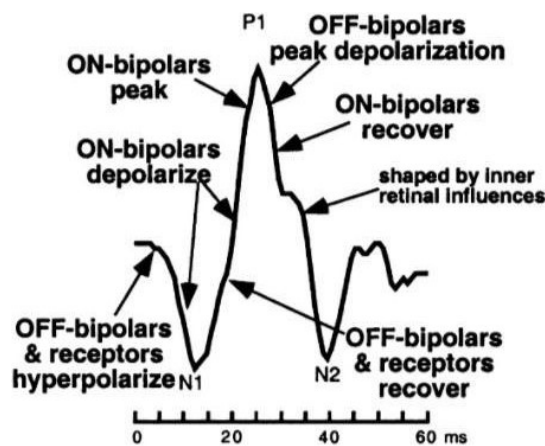


Figura 63. mfERG tipico [23].

La stimolazione consiste in un cambio di *frame* con frequenza tra i 60Hz e i 75Hz in seguito ad un adattamento alla luce di circa 15 minuti con pupilla completamente dilatata, la luminanza degli esagoni *on* deve essere compresa tra i 100cd/m² e i 200cd/m², mentre quella degli esagoni *off* di circa 2cd/m². Viene fornito un punto di fissazione e lo spazio circostante al frame di stimolo deve presentare una luminanza di 100cd/m². Le *m-sequence* devono avere una lunghezza di almeno 4095 combinazioni per raggiungere un sufficiente SNR (*signal to noise ratio*), questo comporta una durata del test di circa 4 minuti per la configurazione a 61 elementi e 8 minuti per la configurazione a 103 elementi. Le rilevazioni sono suddivise in sessioni dai 15 ai 30 secondi. La zona di stimolazione comprende 50° del campo visivo se vista a 32cm di distanza, la larghezza dell'esagono centrale è di circa 3°. La grandezza degli esagoni che compongono lo stimolatore è variabile, in particolare aumenta con l'aumentare dell'eccentricità per poter registrare segnali mfERG della stessa ampiezza. È possibile considerare la media dei segnali per ogni anello di esagoni, tale valore dovrebbe rimanere costante con l'aumentare dell'eccentricità, per questo è utile ad individuare anomalie retiniche [22-23].

Il segnale mfERG consente di costruire delle mappe topografiche dell'attività retinica, i grafici 3D che ne derivano devono essere accompagnati dai relativi *array* di tracce ERG in quanto vi è la completa perdita di informazioni sulla forma d'onda del segnale (figura 64). Inoltre se la mappa topografica è in rapporto alle dimensioni delle aree stimulate (esagoni) si nota un picco nell'area centrale anche se la risposta non risulta maggiore [22].

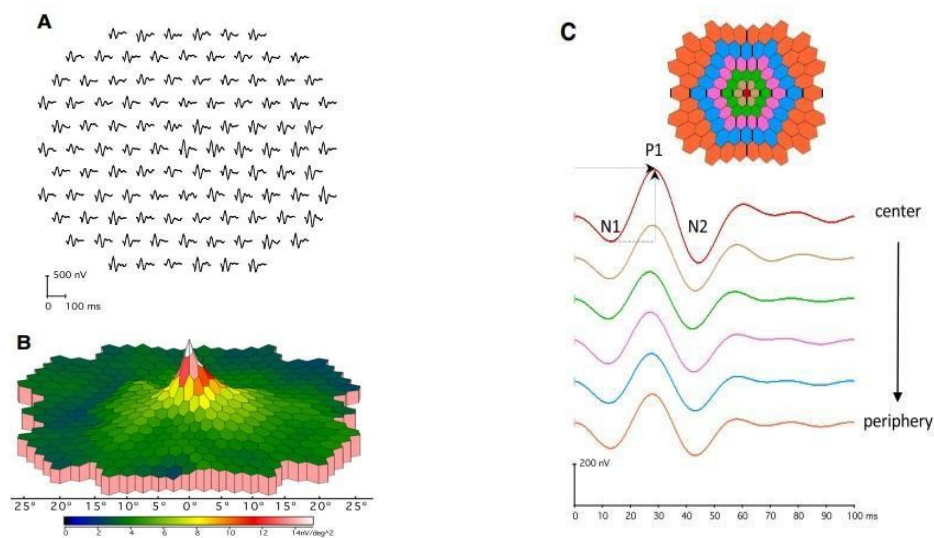


Figura 64. (A) Array di segnali mfERG. (B) Mappa topografica con picco centrale. (C) media di anello. Relativo ad un mfERG di controllo [22].

Determinati artefatti possono distorcere il segnale mfERG: interferenze di rete a 50Hz/60Hz, in questo caso non è consigliato utilizzare un filtro *notch* in quanto il segnale presenta elevata potenza per quel range di frequenze, è invece utile migliorare il contatto degli elettrodi e schermare i relativi cavi; eccentricità di fissazione, tale disturbo è riscontrabile in uno spostamento del valore massimo dal punto centrale; i movimenti oculari determinano una riduzione della risposta centrale e una sovrapposizione delle risposte di esagoni adiacenti, se non sono dovuti a particolari patologie l'unico modo per evitare tale distorsione è ripetere la misurazione; se vengono applicati filtri di media tra esagoni limitrofi il segnale originale potrebbe essere distorto, in questo caso è utile considerare sia il tracciato originale che il tracciato filtrato [22].

Al fine dell'elaborazione il segnale viene filtrato tra i 5Hz e i 200Hz. Il campionamento avviene con frequenza di almeno 1KHz [22].

Pattern electroretinogram (pERG)

Il segnale pERG è la risposta retinica in seguito alla stimolazione con un *pattern* dinamico a luminosità media costante. In particolare viene utilizzato per indagare la funzionalità delle cellule retiniche della macula, la stimolazione infatti non comprende tutto il campo visivo. È utile a discriminare patologie della retina da patologie del nervo ottico in presenza di potenziali evocati visivi anomali [24].

La stimolazione consiste in una scacchiera luminosa (figura 65), con quadrati bianchi e neri, che inverte il contrasto 4 ± 0.8 volte al secondo (circa 2Hz). Ogni quadrato ha una larghezza di $0.8^\circ (\pm 0.2^\circ)$, la scacchiera complessivamente occupa 15° del campo visivo [24].

La risposta standard consiste in una variazione transiente del potenziale caratterizzata da tre curve principali nominate in base al tempo di risposta (o tempo di picco): N35, P50 e N95 (figura 66). Il segnale si completa ad ogni inversione di contrasto e per via della scarsa ampiezza ($2-8\mu V$) è opportuno applicare una media delle rilevazioni, per una stimolazione a 4rps (*reverse per second*) vengono utilizzate epoche di 250ms con almeno 300 rilevazioni [24].

Il segnale viene acquisito per mezzo di un filtro con banda passante tra 1Hz e 100Hz. È controindicato l'utilizzo di filtri *notch* per la rimozione dell'interferenza di rete in quanto distorcono il segnale. Il campionamento avviene con frequenza di almeno 1KHz [24].



Figura 65. *Pattern* di stimolazione

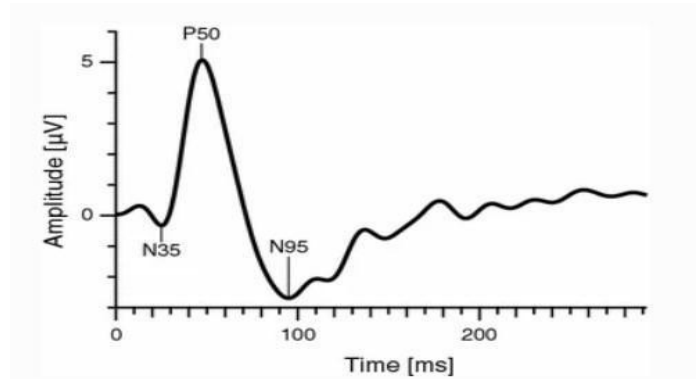


Figura 66. Risposta pERG tipica [24].

Esempi di segnali patologici

Nel caso di retinite pigmentosa, valutando il ffERG si osserva un segnale DA 0.01 ridotto e l'onda a presenta ampiezza minore nei segnali DA 3.0 e DA 10, questo conferma una disfunzione dei bastoncelli. Nei segnali LA 30Hz e LA 3.0 si riscontra un ritardo e una riduzione dell'onda b, ma la disfunzione dei coni è di minore entità rispetto a quella dei bastoncelli. Prendendo in considerazione il pERG (P50) e il mfERG si può rilevare una conservazione delle funzioni della macula prima che la patologia raggiunga stadi avanzati (figure 67-68) [25].

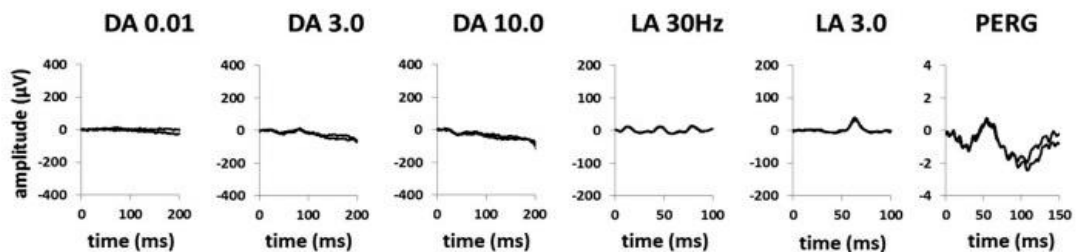


Figura 67. ffERG e pERG retinite pigmentosa [25].

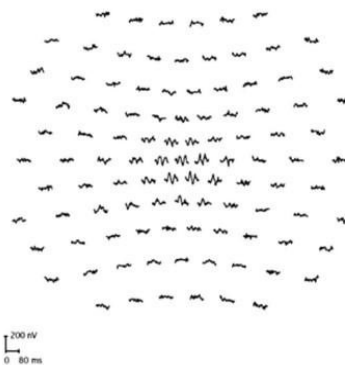


Figura 68. mfERG retinite pigmentosa [25].

Nel caso di maculopatia il segnale ffERG può risultare invariato, mentre il segnale pERG risulta gravemente compromesso. Dal segnale mfERG si nota come il segnale proveniente dalla macula sia gravemente attenuato (figure 69-70) [25].

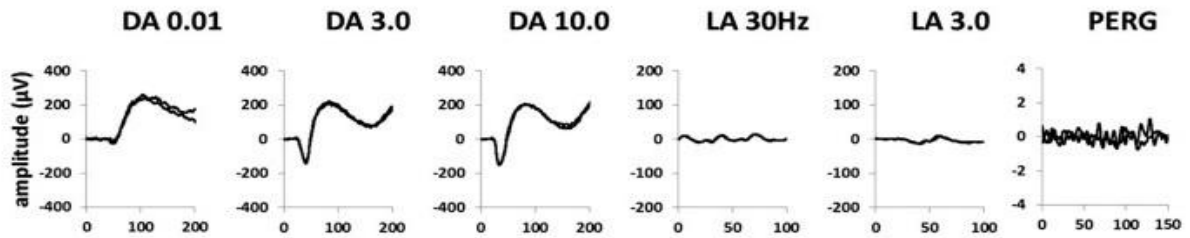


Figura 69. ffERG e pERG maculopatia [25].

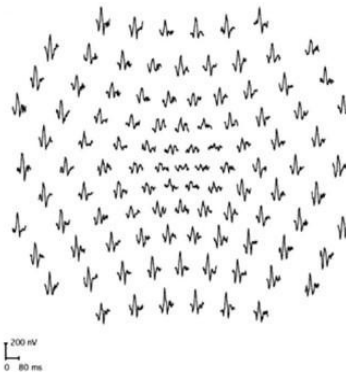


Figura 70. mfERG maculopatia [25].

Nel caso di distrofia dei coni si nota un'alterazione dei segnali ffERG LA per via del malfunzionamento dei coni e il segnale pERG risulta gravemente compromesso per via della relativa disfunzione della macula (figura 71). Attraverso il segnale mfERG si riscontra una riduzione della risposta centrale come per la maculopatia [25].

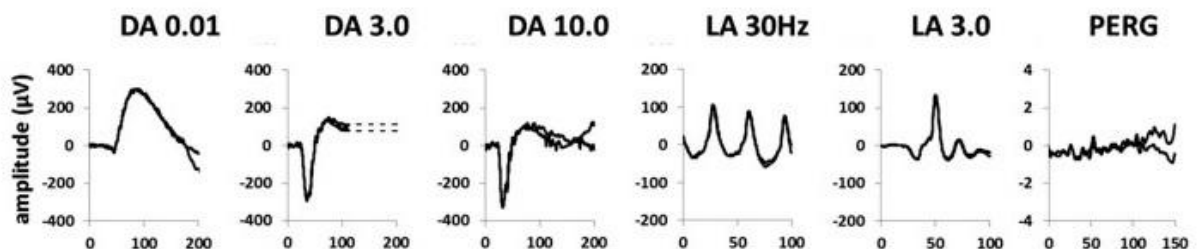


Figura 71. ffERG e pERG ditrofia dei coni [25].

In presenza di neurite ottica il segnale *pattern-reversal* VEP risulta ritardato (l'onda P100 si può verificare a 135ms) per via della demielinizzazione che provoca l'infiammazione, inoltre

può essere più o meno ridotto in ampiezza. Il segnale pERG nel 35% dei casi presenta una riduzione del rapporto N95:P50 per via del possibile coinvolgimento delle cellule gangliari retiniche (figura 72) [25].

Nel caso di ischemia ottica anteriore non arteritica (infarto del disco ottico senza infiammazione dei vasi sanguigni) si verifica una completa attenuazione del segnale *pattern-reversal* VEP, mentre il segnale pERG presenta una riduzione del rapporto N95:P50 e del tempo di picco dell'onda P50. Questo indica un'importante disfunzione del nervo ottico (figura 73) [25].

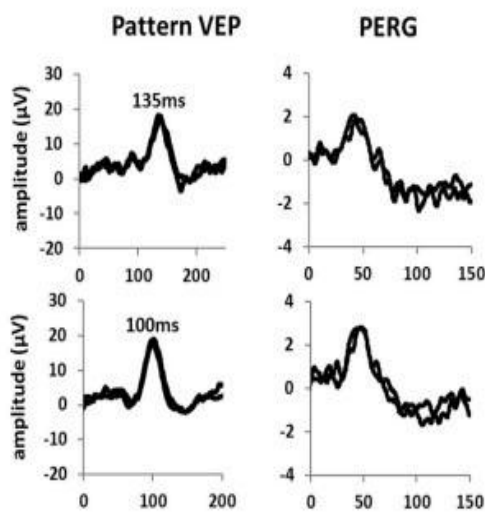


Figura 72. *pattern-reversal* VEP e pERG neurite ottica (sopra) e occhio sano (sotto) [25].

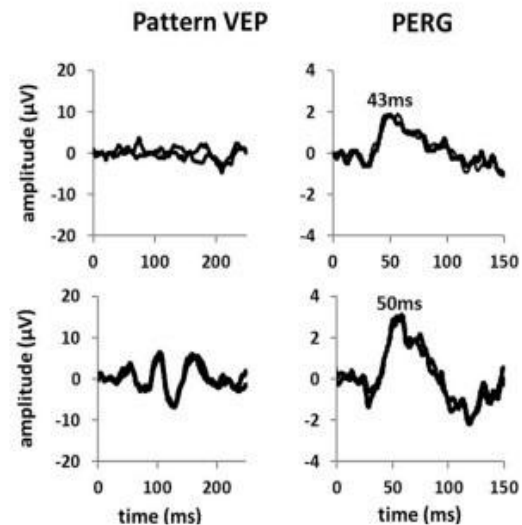


Figura 73. *pattern-reversal* VEP e pERG per ischemia ottica non arteritica (sopra) e occhio sano (sotto) [25].

3.4 Bioimmagini retiniche

Al fine di diagnosticare e valutare lo stato di avanzamento di patologie come retinopatie dovute al diabete, glaucoma e degenerazioni della macula, sono state sviluppate diverse tecniche di estrapolazione di immagini del fondo oculare. Tra le tecniche più utilizzate vi sono le fotografie del fondo oculare, l'autofluorescenza del fondo oculare (FAF), l'angiografia con fluoresceina (FA), la tomografia ottica a coerenza di fase (*optical coherence tomography*, OCT) e l'angiografia tramite OCT [26].

Fotografie del fondo oculare

Le fotografie del fondo oculare possono essere acquisite in vari modi a seconda del tipo di sorgente luminosa utilizzata per illuminare la retina [27].

Per le fotografie a colori viene utilizzata una fonte luminosa anulare: attraverso un sistema di lenti la luce giunge alla retina e viene in parte riflessa, la luce riflessa attraversa altre lenti e viene acquisita dalla fundus camera (figura 74) in modo digitale utilizzando dispositivi di accoppiamento di carica, oppure in modo analogico per mezzo di film fotosensibili [27]. Questa tipologia di immagini retiniche può essere acquisita in SBFi (*Smartphone Based Fundus Imaging*). Dunque è possibile utilizzare la torcia integrata dello smartphone come fonte luminosa e una lente da fondoscopia applicata all'obiettivo per permettere la messa a fuoco della retina (figura 75). In condizioni di pupilla non dilatata (miosi) il campo visivo risulta di circa 20° , mentre in condizioni di pupilla dilatata (midriasi) è possibile raggiungere i 56° di ampiezza, sufficienti ad individuare disco ottico e macula (figura 76). La SBFi è utile ai fini della telemedicina in ambito oftalmico e l'intelligenza artificiale contribuisce ad aumentarne l'efficacia, infatti determinati algoritmi di riconoscimento possono estrarre dai video i frame più nitidi ed essere di supporto al medico nell'individuare la diagnosi [28].



Figura 74. CSO Cobra fundus camera.



Figura 75. Paxos scope, lente da fondoscopia.



Figura 76. Immagine retinica a colori acquisita da smartphone con paxos scope, circa 56° di campo visivo [28].

L'oftalmoscopia a scansione laser (SLO) consiste nell'illuminare la retina utilizzando un laser puntiforme ad una specifica lunghezza d'onda. Il laser viene traslato su linee orizzontali parallele al fine di coprire il campo visivo accessibile dalla pupilla, l'immagine è formata dalla luce riflessa ad ogni traslazione. Tale tecnologia consente di acquisire immagini con maggiore contrasto per via della riduzione del fenomeno di *scattering* luminoso presente nelle immagini standard. È possibile utilizzare un'apertura confocale (cSLO) per acquisire molteplici immagini su piani di messa fuoco differenti, ciò permette la ricostruzione tridimensionale del fondo oculare, utile soprattutto per indagare il disco ottico in caso di glaucoma (figura 78). Normalmente viene ispezionata dal 5% al 15% della superficie della retina, ovvero dai 30° ai

50° di campo visivo. Per valutare anche le zone retiniche periferiche è necessario utilizzare tecniche di *ultra-widefield* (UWF) tramite uno specchio ellissoidale a due lunghezze focali raggiungendo un campo visivo interno di 200°, che corrisponde ad un campo visivo esterno dai 135° ai 150° (figura 79) [27].

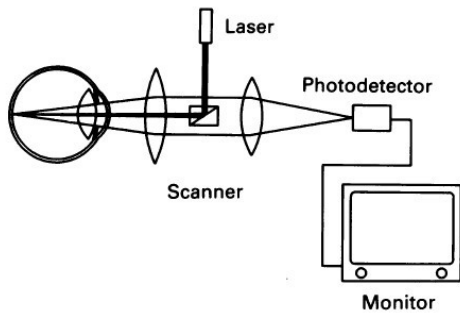


Figura 77. Schema strutturale SLO (29)

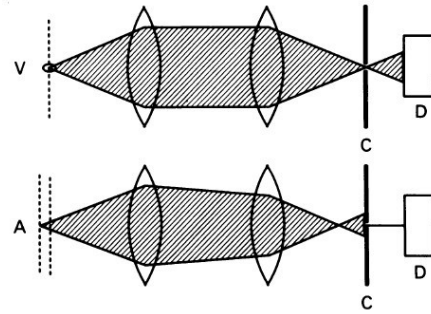


Figura 78. Principio di funzionamento cSLO, l'apertura confocale permette l'acquisizione in D della luce riflessa dal voxel V bloccando la luce proveniente da altri piani di riflessione come in A [29].

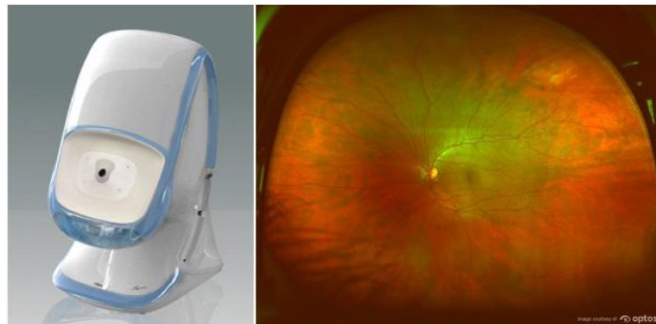


Figura 79. Optos camera per UWF, immagine retinica UWF [29].

Risulta utile acquisire immagini utilizzando illuminazioni monocromatiche in quanto la penetrazione della radiazione nel tessuto dipende dalla sua lunghezza d'onda. Lunghezze d'onda elevate penetrano più in profondità consentendo di indagare le strutture della retina esterna e della coroide, al contrario lunghezze d'onda ridotte consentono lo studio degli strati interni della retina come la reti di capillari e lo strato di fibra nervosa. L'utilizzo di lunghezze d'onda intermedie, come il verde (*red-free*), consente di acquisire ottime immagini retiniche particolarmente sensibili ad eventuali emorragie (figura 80). Tale metodologia è utilizzata spesso in SLO con laser monocromatici [27].

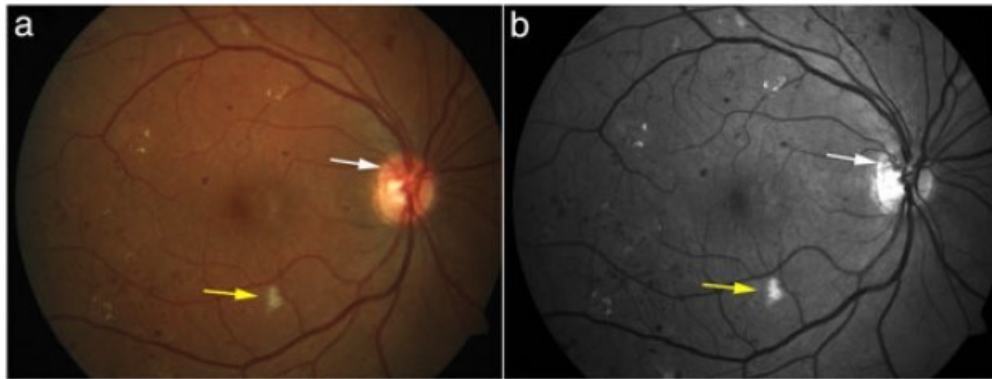


Figura 80. Immagine retinica nel caso di retinopatie diabetiche, la freccia gialla indica micro emorragie e micro aneurismi, la freccia bianca indica neovascolarizzazione sul disco ottico. (a) immagine del fondo a colori, (b) immagine red-free [26].

Angiografia del fondo oculare

Al fine di valutare l'integrità del microcircolo della retina e della coroide vengono utilizzati due diversi mezzi di contrasto fluorescenti: fluoresceina sodica (FAG) e indocianina verde (ICG). La fluoresceina sodica ($C_{20}H_{10}Na_2O_5$) se illuminata da luce blu (465-490nm) emette luce verde tra i 520nm e i 530nm. Grazie all'utilizzo di laser a banda stretta e filtri ottici è possibile acquisire solo l'intorno delle lunghezze d'onda di interesse. La sostanza viene iniettata nel circolo sanguigno dal braccio o da altre zone del corpo e in pochi secondi (circa 10 secondi) raggiunge i vasi della retina. In seguito viene eliminata dall'organismo in circa 48 ore. Tale esame è utile ad indagare principalmente il microcircolo della retina (figura 81) [30].

Per esaminare la rete capillare della coroide viene utilizzata l'indocianina verde ($C_{43}H_{47}N_2NaO_6S_2$). Tale sostanza presenta un intervallo di assorbimento e riflessione negli infrarossi (805-835nm), lunghezze d'onda alle quali l'epitelio pigmentato retinico risulta invisibile (figura 81) [31].

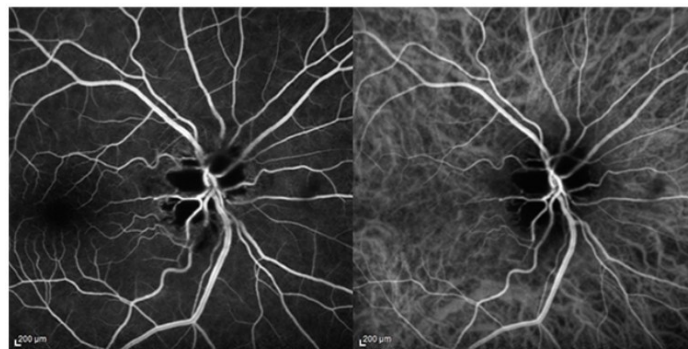


Figura 81. FAG (sinistra) e ICG (destra) caso di neurite ottica ischemica anteriore.

Autofluorescenza del fondo oculare (FAF)

Determinate strutture del tessuto retinico presentano una spontanea fluorescenza se colpite da radiazioni luminose a precise lunghezze d'onda. Utilizzando un dispositivo SLO con illuminazione blu (488nm) la principale fonte di autofluorescenza è data dalla lipofuscina che a sua volta emette luce gialla in una banda compresa tra i 500nm e i 700nm (figura 82). Durante il ciclo visivo i fotorecettori producono la lipofuscina come sostanza di scarto, questa viene accumulata e smaltita dalle cellule dell'epitelio pigmentato. L'accumulo di lipofuscina all'interno o all'esterno delle cellule epiteliali causa un aumento patologico del segnale FAF, al contrario un ciclo visivo lento, atrofia dell'epitelio pigmentato e emorragie contribuiscono alla diminuzione del segnale FAF [32]. Altre lunghezze d'onda, come gli infrarossi e il verde, possono essere utilizzate per la stimolazione al fine di variare la penetrazione all'interno del tessuto e l'assorbimento da parte dell'epitelio pigmentato [27].

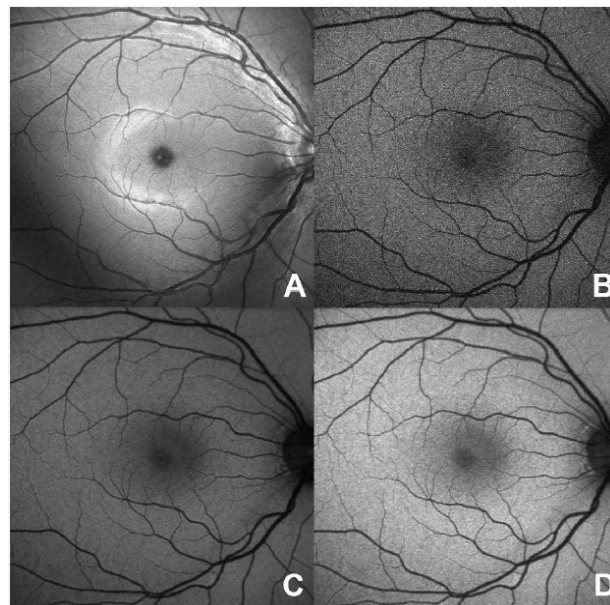


Figura 82. Immagine in autofluorescenza con stimolazione a luce blu. (A) immagine senza filtri in acquisizione, (B) immagine acquisita con l'apposizione di filtri ottici, viene introdotto del rumore, (C) immagine elaborata con filtri di media su *frame*, (D) immagine elaborata con equalizzazione dell'istogramma in scala di grigi 0-255 [32].

Tomografia ottica a coerenza di fase (OCT)

La tecnica OCT risulta particolarmente utile quando viene richiesta un'indagine approfondita dello stato del disco ottico, come nel caso del glaucoma, poiché permette di ottenere immagini ad alta risoluzione del fondo oculare. Il principio di funzionamento è analogo a quello utilizzato

per la realizzazione di immagini ad ultrasuoni, ma al posto delle onde acustiche viene utilizzata la luce. La combinazione tra la luce riflessa dal tessuto analizzato e da uno specchio di riferimento produce particolari interferenze sulla base delle differenze tra le due fonti luminose (figura 83). Per via della ridotta lunghezza d'onda delle radiazioni luminose rispetto alle onde sonore, la tecnica OCT permette una migliore risoluzione assiale ($3\text{-}8\mu\text{m}$). L'implementazione può avvenire nel dominio del tempo oppure nel dominio della frequenza [27].

Nel dominio del tempo (*Time domain* OCT) viene confrontato il ritardo di riflessione del raggio luminoso diretto al tessuto da analizzare con il ritardo del raggio luminoso di riferimento. Grazie all'interferometria a bassa coerenza (*low coherence intermerometry*), per cui la distanza dello specchio di riferimento viene variata, è possibile individuare la posizione del sito di riflessione dalla sorgente luminosa nel campione. Anche i più piccoli movimenti oculari possono creare artefatti, non è quindi possibile eseguire più di 512 *A-scan* per un tempo di 1.3 secondi, questo comporta l'acquisizione parziale della sezione da valutare e al fine di completare l'immagine in *B-scan* viene utilizzata l'interpolazione (figura 84) [33].

Nel dominio della frequenza (*spectral domain* OCT) lo specchio di riferimento è fisso e il segnale viene acquisito utilizzando uno spettrometro o variando nel tempo la lunghezza d'onda della sorgente luminosa. Le informazioni necessarie sono ricavate attraverso trasformata di Fourier. Questo permette di acquisire dalle 18000 alle 40000 *A-scan* in un secondo limitando gli artefatti da movimento e aumentando la risoluzione (figura 84). Tramite l'acquisizione di *B-scan* adiacenti è possibile la ricostruzione tridimensionale di porzioni del tessuto retinico (figura 85) [33].

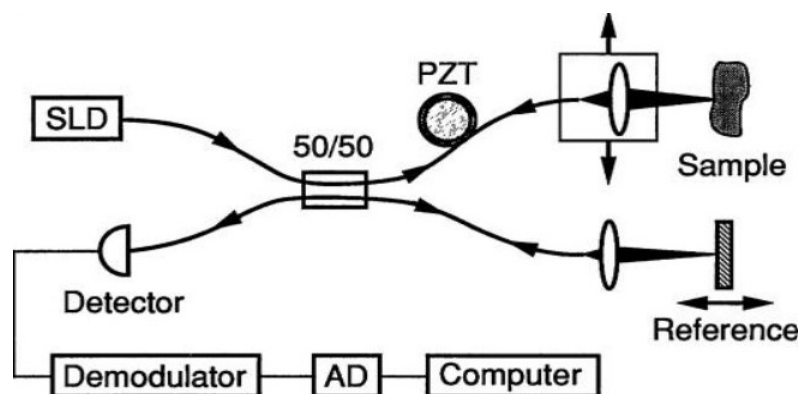


Figura 83. La fonte luminosa è un diodo super-luminescente (LSD), il raggio luminoso è condotto da fibre ottiche e suddiviso in due parti uguali, una diretta al campione e una di riferimento. Il trasduttore piezoelettrico (PZT) applica una modulazione (21.2KHz) al segnale interferometrico. La modulazione interferometrica del segnale di ritorno viene rilevata dal fotosensore quando la latenza dei due segnali, riferimento e campione, è circa uguale. Il segnale di output del detector viene demodulato a 25KHz per formare l'involuppo del segnale interferometrico (*A-scan*), il segnale è poi digitalizzato per l'elaborazione [34].

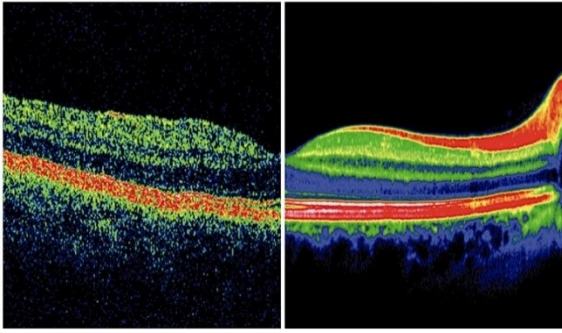


Figura 84. Esempio di OCT della macula di un soggetto tramite OCT *time domain* (sinistra), OCT *spectral domain* (destra) [33].

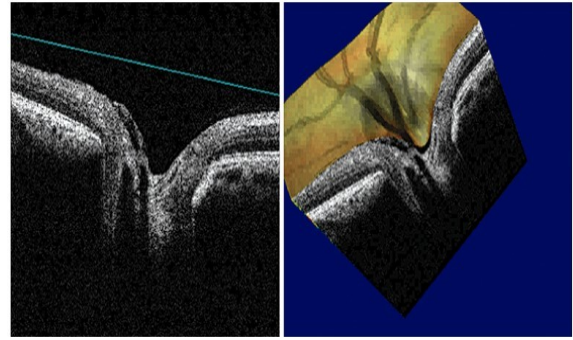


Figura 85. OCT *spectral domain* in B-scan (sinistra) e ricostruzione 3D (destra) [33].

La OCT consente di eseguire in modo non invasivo, veloce e più accurato l'angiografia. Acquisizioni *B-scan* multiple della stessa sezione permettono di individuare le decorrelazioni create dal flusso sanguigno e quindi la posizione dei vasi. La superficie retinica valutata è ristretta rispetto all'angiografia tradizionale per via del grande numero di acquisizioni necessarie e della necessità di limitare il tempo d'esame per evitare artefatti da movimento. Utilizzando tecniche di OCT a *swept-source*, che presentano una fonte luminosa con *frequency sweep* regolabile, è possibile effettuare 400000 *A-scan* al secondo per 3.8 secondi, ovvero 500x500 *A-scan*, ricoprendo quindi una superficie di 12x12mm. Normalmente vengono utilizzate superfici 3x3mm e 6x6mm (figura 86) [35].

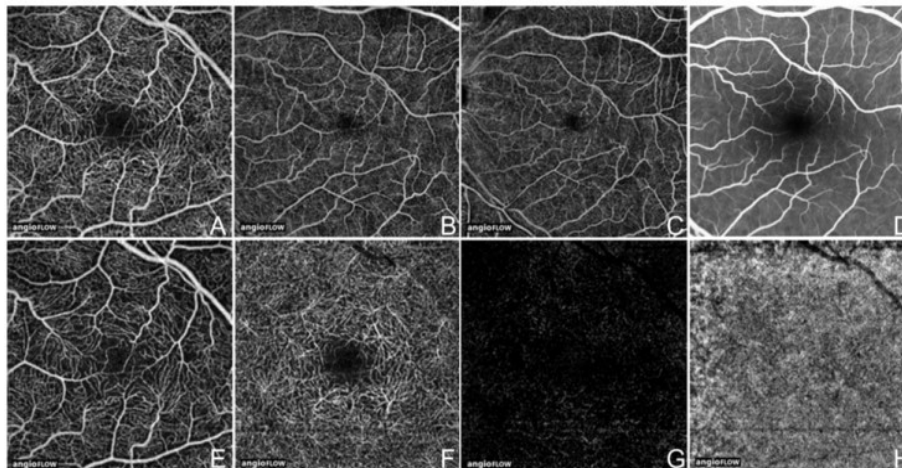


Fig. 86 Immagini relative all'occhio sinistro di un uomo di 56 anni acquisite col sistema RTVue XR Avanti. (A) 3x3mm OCTA. (B) 6x6mm OCTA. (C) 8x8mm OCTA. (D) Angiografia con fluoresceina ristretta ad un'area di 8x8mm o 30°. si nota come fornisca meno dettagli rispetto alle immagini A-C. (E) 3x3mm OCTA superficiale (retina interna). (F) 3x3mm OCTA in profondità (retina interna). (G) 3x3mm OCTA della retina esterna, si nota assenza di vascolarizzazione, i punti bianchi sono dati dal rumore. (H) 3x3mm OCTA della corioide, generalmente risulta omogeneo [35].

5. Sperimentazione della visione artificiale

Patologie come la retinite pigmentosa, distrofie della macula e glaucoma non presentano ad oggi una terapia risolutiva. Attualmente sono in via di sviluppo varie tecniche per realizzare protesi retiniche e impianti neurali. Le prime risultano efficaci in caso di degenerazione delle cellule sensoriali, quindi maculopatie e retinite pigmentosa, in quanto vanno a sostituire l'attività dei fotorecettori. Nel caso di lesioni al nervo ottico, come nel glaucoma, è necessario intervenire sulle vie di trasmissione superiori. Grazie alla magnificazione corticale e all'ordine visuotopico la corteccia visiva, in particolare la corteccia visiva primaria, rappresenta il sito ottimale per l'elettrostimolazione [36].

5.1 Impianti neurali

La possibilità di sollecitare elettricamente la via visiva al fine di indurre la percezione di lampi di luce, detti fosfeni, è stata provata nel 1929 dal neurologo Otfried Foester. Successivamente le ricerche di Brindley e Lewin nel 1968 portano al primo impianto sulla corteccia visiva dell'emisfero destro di un *array* di 80 elettrodi in grado di provocare fosfeni in diverse zone del campo visivo. Nel 1974 gli scienziati Dobelle and Mladjilovski comprendono la giusta posizione, la dimensione e i parametri di stimolazione degli elettrodi. Tramite un *array* di 64 elettrodi in platino su una matrice di teflon, due individui non vedenti sono in grado di distinguere semplici pattern come quadrati o grandi lettere [37].

Nel 2000 Dobelle and Mladjilovski realizzano il primo impianto neurale connesso ad una fotocamera esterna capace di produrre una mappa planare di fosfeni in una regione 7x20cm alla distanza di un braccio (figure 87-88). La camera era caratterizzata da un rapporto focale f 14.5, 69° di ampiezza di campo e regolazione dell'esposizione automatica. Le immagini venivano elaborate da un computer portatile che montava un processore a 120MHz con 32MB di memoria RAM e un disco rigido di 1.5GB, un altro microcontrollore produceva i segnali di stimolo diretti al *array* corticale. L'impianto subdurale, ovvero impiantato tra la dura madre e l'aracnoide, era composto da un foglio di platino con fori di diametro 3mm al cui centro vi erano gli elettrodi di superficie di 1mm di diametro (figure 89-90). Gli stimoli per la produzione di un fosfene consistevano in treni di 6 impulsi a 30Hz e la visualizzazione più stabile garantiva un *frame rate* di 4 *frame* al secondo. Gli stimoli erano impulsi simmetrici bifasici della durata di 1 μ s, la soglia di attivazione veniva giornalmente ricalibrata e variava dai 10V ai 20V zero-picco.

Modulando l'ampiezza dello stimolo era possibile variare l'intensità dei fosfeni, in alcuni casi questo comportava anche la percezione di fosfeni di differente colore [38].



Figura 87. Sistema di visione artificiale sviluppato da Dobelle e Mladjilovski [38].

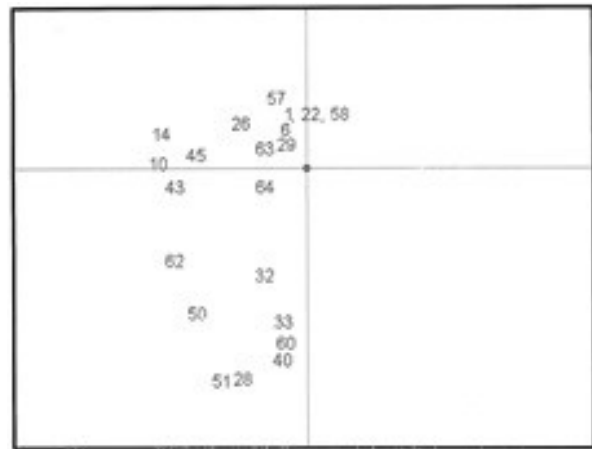


Figura 88. Mappa di fosfeni generati dall'impianto corticale [38].

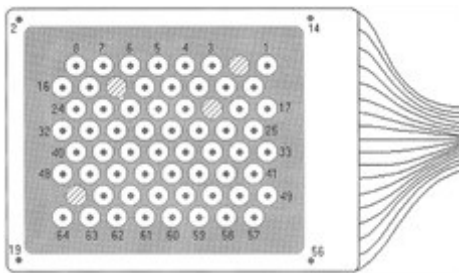


Figura 89. Elettrodo corticale di superficie [38].

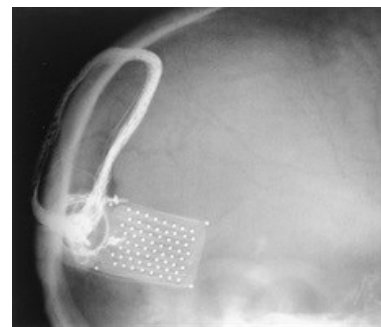


Figura 90. raggi X dell'impianto corticale [38].

Ad oggi sono state sviluppate o sono in via di sviluppo tecnologie che si ispirano al modello di Dobelle: una telecamera esterna acquisisce le immagini che vengono elaborate da un processore al fine di produrre i segnali utili all'elettrostimolatore corticale impiantato [37].

Orion system (Second Sight Medical Products)

L'azienda Second Sight ha sviluppato un impianto neurale riutilizzando i componenti esterni (camera, VPU *video processing unit* e l'antenna di trasmissione) di un precedente progetto, ovvero la protesi retinica Argus II. L'impianto prevede inoltre un'antenna di ricezione e il circuito di comando del *array* corticale impiantato direttamente sul cranio. Lo stimolatore consiste in una matrice di 60 elettrodi di superficie impiantata in modo subdurale sul lobo

occipitale mediale, non è quindi prevista penetrazione corticale (figura 91). Dopo aver provato che il sistema è in grado di produrre fosfeni in modo sicuro, il progetto ha ricevuto l'approvazione della *Food and Drug Administration* (FDA) per iniziare i test clinici [37].

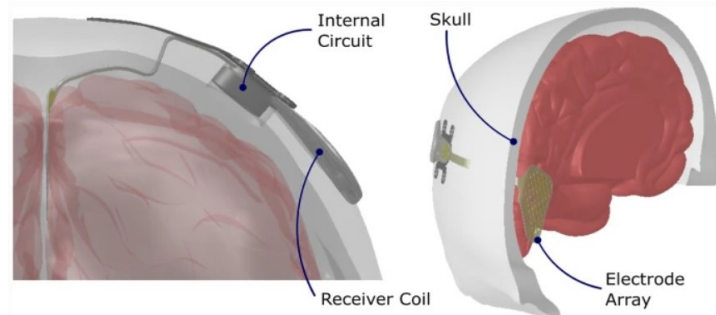


Figura 91. Schema dell'impianto Orion [37].

Utah Electrode Array (John A. Moran Eye Center at the University of Utah and Spain's Miguel Hernández University)

Dalle sperimentazioni nel campo dell'elettrostimolazione corticale è emerso che la stimolazione della corteccia visiva per mezzo di elettrodi di superficie porta ad una bassa risoluzione spaziale della percezione dei fosfeni, infatti è stato riscontrato che la stimolazione contemporanea di elettrodi adiacenti provoca la percezione di fosfeni di grandi dimensioni rendendo difficile il riconoscimento di eventuali figure. Il progetto prevede quindi l'utilizzo di elettrodi che penetrino all'interno della corteccia visiva al fine di ottenere una migliore risoluzione spaziale pur avendo elettrodi molto ravvicinati, oltre che una soglia di stimolazione minore. A tale scopo è stato sviluppato l'Utah Electrode Array (UEA) dal gruppo di ricerca del professor Richard A. Normann. L'UEA consiste in una matrice di 96 micro-ago in silicio lunghi 1.5mm disposti su una superficie 4x4mm dello spessore di 0.25mm. Gli aghi sono ricoperti di ossido di iridio per aumentare la capacità di rilasciare cariche. L'impianto interessa la zona corticale di confine tra V1 e V2 vicino al polo occipitale (figura 92) [39].

Durante il 2021 il sistema è stato impiantato per sei mesi sulla corteccia visiva destra di una donna di 57 anni completamente non vedente da 16 anni per una patologia al nervo ottico. Gli stimoli consistevano in impulsi simmetrici bifasici della durata di $170\mu\text{s}$ per fase con un intervallo interfase di $60\mu\text{s}$, il treno di impulsi per produrre un fosfene aveva durata di 166ms e frequenza 300Hz (figura 92). La soglia di stimolazione per un singolo elettrodo era di

$66.8 \pm 36.5 \mu\text{A}$ e durante la sperimentazione la soglia è aumentata fino a $80.4 \pm 28.8 \mu\text{A}$ (figura 93) [39].

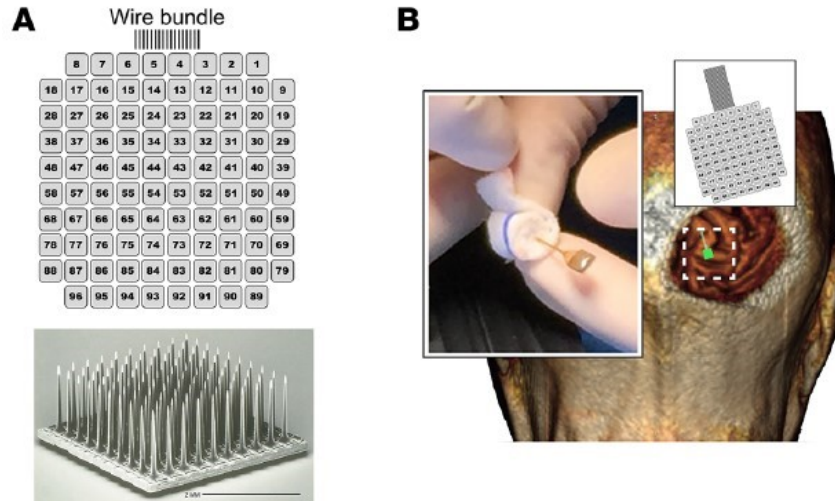


Figura 92. (A) Scansione al microscopio elettronico del UEA con il sistema di numerazione degli elettrodi. (B) Foto del UEA e zona dell'impianto [39].

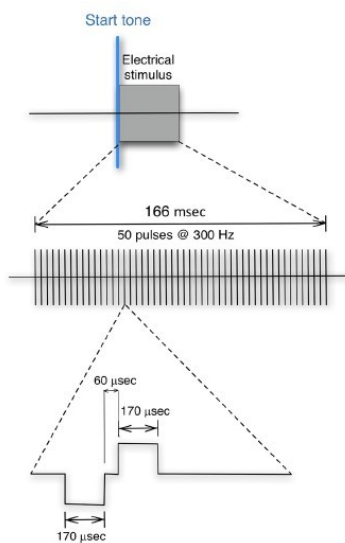


Figura 92. Stimoli elettrici utilizzati per quantificare le soglie di attivazione degli elettrodi [39].

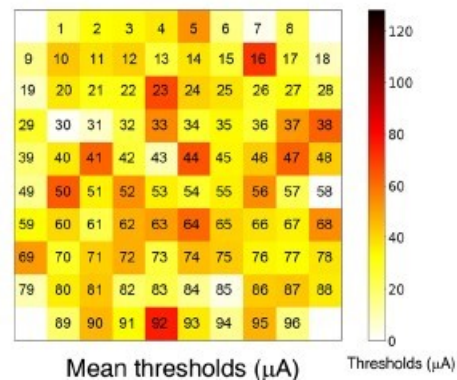


Figura 93. Soglie di attivazione degli elettrodi [39].

Dopo un periodo di allenamento il soggetto era in grado di distinguere i fosfeni provocati dall'elettrostimolazione, percepiti come dei puntini ben definiti sempre nella stessa posizione, dai fosfeni spontanei. Con l'ausilio di segnali acustici che avvisavano la stimolazione e una tavoletta grafica wireless è stato possibile costruire la mappa dei fosfeni generati (figura 94).

L'attivazione simultanea di più elettrodi permetteva il riconoscimento di linee orizzontali, linee verticali e lettere (figura 95) [39].

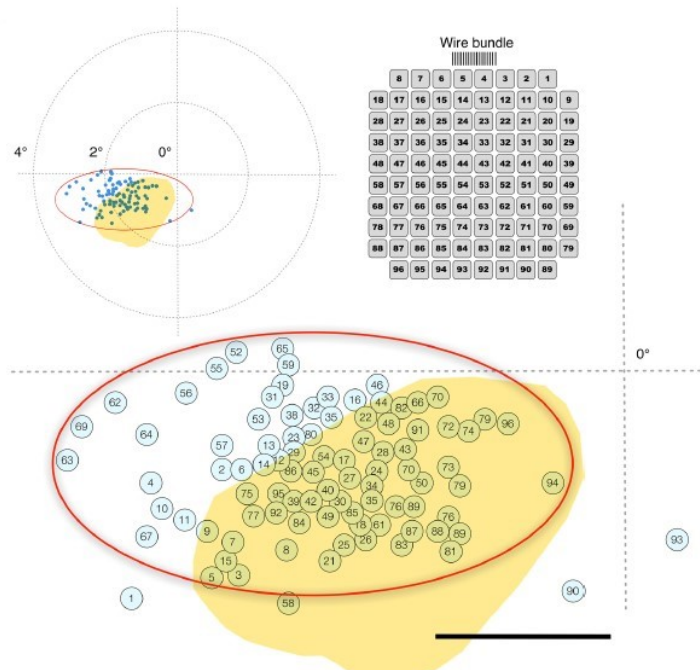


Figura 94. Mappa di fosfeni generati dall'elettrostimolazione, la regione gialla indica la locazione attesa sulla base di una mappa retinotopica standard [39].

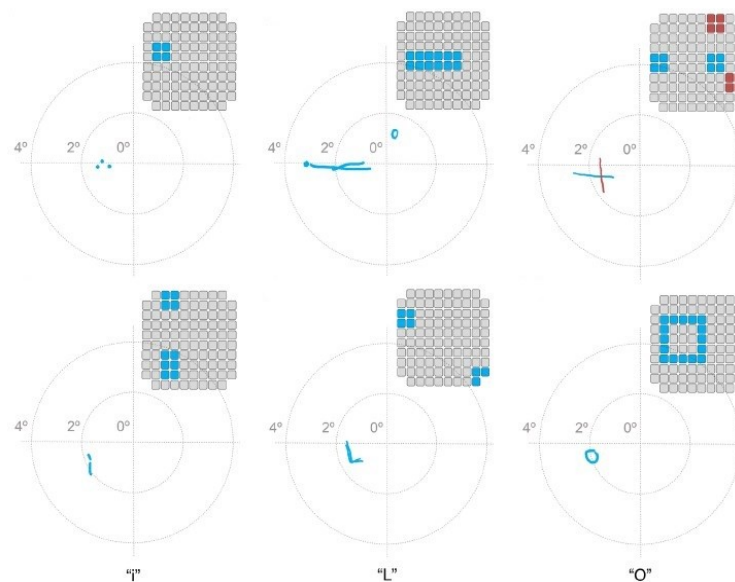


Figura 95. Esempi di stimolazioni simultanea di più elettrodi [39].

È stato utilizzato un codificatore retinale al fine di condurre esperimenti sulla visione artificiale prodotta dal *array*. Il sistema consisteva in una videocamera montata su degli occhiali, le immagini venivano elaborate a livello hardware e software allo scopo di estrarre le informazioni

più rilevanti dalla scena inquadrata, il segnale di uscita dal codificatore retinale veniva acquisito dallo stimolatore (CereStim 96) che generava i segnali indirizzati agli elettrodi. Grazie a tale sistema il soggetto è stato in grado di indicare i bordi di bande bianche e nere verticali e orizzontali (figura 96), oltre che individuare la posizione di un quadrato bianco 20x20cm su uno schermo da 21 pollici posto a 50cm di distanza. Dopo i 6 mesi di sperimentazione il dispositivo è stato espantato senza che venissero riportati effetti collaterali o complicazioni [39].



Figura 96. Il soggetto riesce ad individuare il bordo tra bande nere e bianche utilizzando il codificatore retinale [39].

Gennaris (Monash Vision Group)

Il sistema in via di sviluppo del Monash Vision Group della Monash University consiste in molteplici impianti corticali capaci di ricevere i segnali e l'alimentazione in modalità *wireless* così da evitare un collegamento cablato transcranico (figura 97). Gli elettrodi sono organizzati in matrici indipendenti da 43 elementi ($9 \times 9 \times 2.5 \text{mm}^3$) capaci di penetrare fino al quarto strato della corteccia visiva V1, considerato come obiettivo migliore per l'elettrostimolazione (figura 98). I micro-ago di platino e iridio hanno diametro di $127 \mu\text{m}$ e sono isolati elettricamente da uno strato di $3 \mu\text{m}$ di perilene (idrocarburo policiclico aromatico). Utilizzando tecniche laser viene scoperta una porzione cilindrica alta $70 \mu\text{m}$ a 1.5mm dalla base per costituire il contatto elettrico. La scelta di suddividere gli elettrodi in gruppi indipendenti permette un migliore adattamento dell'impianto alla conformazione della corteccia evitando lesioni del microcircolo sanguigno. Il funzionamento si basa su un processore capace di acquisire le immagini catturate da una videocamera esterna e di codificarle nelle sequenze di stimoli, i segnali vengono acquisiti dagli *Application-Specific Integrated Circuits* (ASICs), dei circuiti integrati presenti all'interno della capsula ceramica di ogni modulo corticale, il protocollo di comunicazione

prevede l'invio di segnali di controllo e non della forma d'onda di stimolazione memorizzata dal ASIC. Al momento l'impianto è stato testato su tre pecore al fine di indagare i possibili effetti collaterali dell'elettrostimolazione. Dopo sei mesi di test utilizzando impulsi bifasici simmetrici di ampiezza $\pm 109\mu\text{A}$ e durata massima di $300\mu\text{s}$ per fase non sono stati riscontrati danni a lungo termine [36-40].

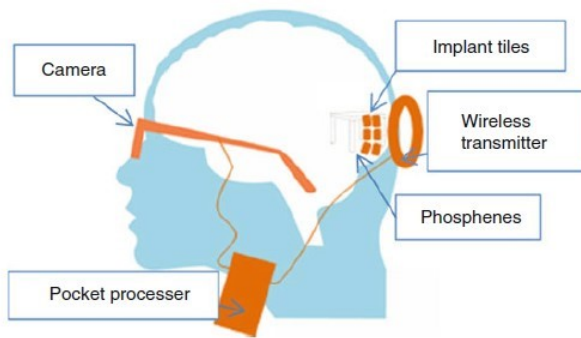


Figura 97. Schema del sistema di visione bionica Gennaris [40].

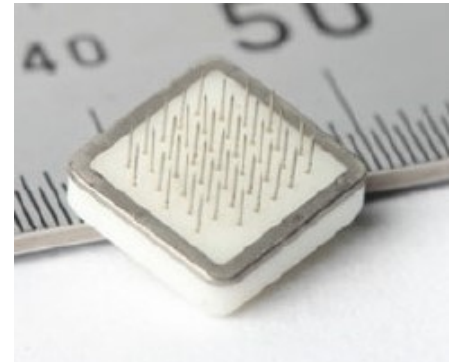


Figura 98. Modulo corticale Gennaris prima dell'isolamento con perilene [40].

5.2 Impianti retinici

Durante I primi anni del 1990 i ricercatori Mark Humayun, Robert Greenberg e Eugene de Juan della Johns Hopkins University dimostrano per la prima volta in un modello animale che l'elettrostimolazione focalizzata della retina induce la percezione di fosfeni. Successivamente il gruppo di ricerca si sposta alla University of Southern California per iniziare una collaborazione con l'azienda Second Sight al fine di sviluppare il primo prototipo di protesi retinica, ovvero Argus I. Il dispositivo prevedeva l'impianto epiretinale di una matrice 4x4 di elettrodi. Nel 2002 comincia la prima fase di sperimentazione sull'uomo e dati i risultati positivi l'azienda ha implementato la seconda versione [41].

Argus II (Second Sight Medical Products)

Il sistema è costituito da tre componenti esterne e tre componenti interne. Esternamente si trovano: una videocamera montata su degli occhiali che acquisisce in tempo reale le immagini, una VUP (*visual processing unit*) portatile che processa l'immagine al fine di tradurle in sequenze di stimoli elettrici e un'antenna esterna che permette la trasmissione in RF dei segnali di uscita dalla VUP e dell'alimentazione ai componenti interni (figura 99). La parte interna è costituita da: un avvolgimento che permette la conversione delle onde radio in segnali elettrici

e alimentazione, un circuito ASIC gestisce gli impulsi elettrici degli elettrodi sulla base dei dati ricevuti attraverso gli avvolgimenti (figura 100). Gli elettrodi superficiali di platino sono organizzati in una matrice 6x10 su una base in poliammide, presentano un diametro di $200\mu\text{m}$ e distano l'uno dall'altro $575\mu\text{m}$ centro-centro, ciascun elettrodo è connesso singolarmente al ASIC. L'impianto è epiretinale, ovvero la matrice di elettrodi viene posta in diretto contatto con lo strato interno della retina composto dalle cellule gangliari retiniche (figura 101) [41].



Figura 99. Parti esterne del sistema Argus 2 [41].

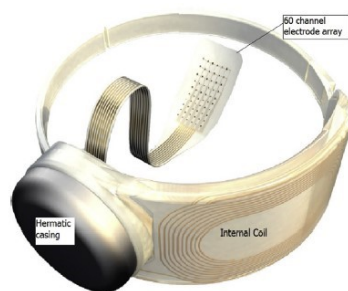


Figura 100. Parti interne del sistema Argus 2 [41].

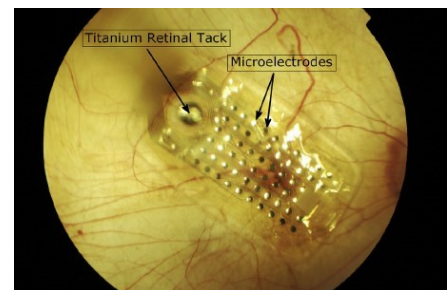


Figura 101. Immagine a colori del fondo oculare con applicato l'elettrodo Argus 2 [41].

Il numero limitato di elettrodi non consente la sostituzione di milioni di fotorecettori, dunque per raggiungere notevoli risoluzioni spaziali sarebbe necessaria una matrice 25x25 da applicare sulla macula. La configurazione 6x10 permette comunque una ragionevole visione per la navigazione spaziale e modeste prestazioni in lettura con riconoscimento di lettere e parole di grandi dimensioni. Attraverso tecniche di aumento del contrasto dei bordi è stato possibile aumentare le prestazioni nel riconoscimento di oggetti 3D [41].

Questa protesi è caratterizzata dalla dissociazione tra la posizione degli occhi e la scena acquisita dalla fotocamera, inoltre l'immagine elaborata viene proiettata sempre sulla stessa area della retina. Al fine della localizzazione spaziale durante i test i soggetti mantenevano lo sguardo fisso muovendo la testa per cambiare direzione dello sguardo, in questo modo sono stati in grado di individuare la posizione di un quadrato luminoso su uno schermo [41].

Tale sistema ha ricevuto il marchio CE nel 2011 e l'approvazione alla commercializzazione come dispositivo umanitario dalla FDA nel 2013. Dalla prima commercializzazione sono 350 gli impianti effettuati e sono state rilevate prestazioni molto variabili [41].

NR600 (Nano Retina)

Nano Retina è un'azienda israeliana fondata nel 2009 da Yossi Gross, esperto in tecnologie mediche e fondatore di Rainbow Medical, e Jim von Ehr, esperto in nanotecnologie e fondatore di Zyvex Labs. Dopo anni di ricerca è stata sviluppata la protesi retinica NR600 e il primo impianto risale al 2020 in Israele. Nell'ottobre del 2021 alla Fondazione Policlinico Universitario Agostino Gemelli IRCCS di Roma è stata impiantata con successo su un settantenne affetto da retinite pigmentosa. La sperimentazione è ancora in corso e interesserà 20 soggetti affetti da retinite pigmentosa o distrofia dei fotorecettori che verranno seguiti per due anni dall'impianto [42].

Il dispositivo consiste in un chip (diametro di 5mm e spessore 1mm) impiantato sulla superficie interna della retina con lo scopo di sostituire l'attività elettrica dei fotorecettori danneggiati. L'impianto non prevede altre componenti, il chip contiene un dispositivo di acquisizione delle immagini e un processore che le traduce in segnali elettrici liberati dagli elettrodi. Gli elettrodi, 400 in tutto, sono caratterizzati da una forma tridimensionale (3DNi), sono quindi capaci di penetrare all'interno della retina attuando una precisa stimolazione delle cellule retinali (figura 102). Un elemento fotovoltaico sulla superficie del chip produce l'alimentazione richiesta dal laser ad infra-rossi generato da specifici occhiali, i quali consentono inoltre una regolazione fine dell'impianto (figura 103) [42].

A differenza di Argus II tale sistema utilizza le vie ottiche del soggetto, è quindi possibile indirizzare lo sguardo attraverso i movimenti oculari, inoltre il maggior numero di elettrodi consente una risoluzione spaziale migliore. L'intervento risulta poco invasivo in quanto non necessita di strutture esterne al bulbo oculare. In seguito all'intervento è necessario un periodo di riabilitazione per istruire il soggetto all'utilizzo della vista bionica tramite fosfeni [42].

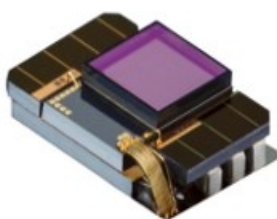


Figura 102. Chip NR600 e occhiali Nano Retina [42].

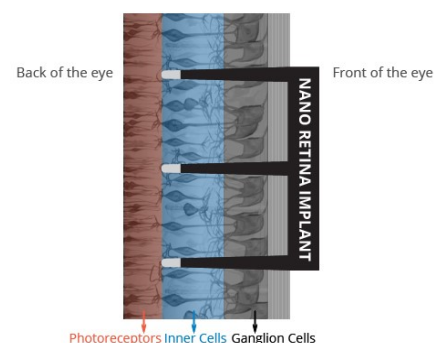


Figura 103. Schema dell'impianto di NR600 [42].

Retina liquida (NOVAVIDO)

La collaborazione tra l'Istituto Italiano di Tecnologia e l'ospedale IRCCS Sacro Cuore Don Calabria di Negrar durata 10 anni ha portato alla nascita nel 2021 della società NOVAVIDO. La start-up con sede a Bologna si occupa dello sviluppo di una protesi retinica liquida capace di sostituire almeno parzialmente l'attività dei fotorecettori danneggiati da patologie come la retinite pigmentosa [43].

Questa tecnologia si basa su nanoparticelle fotosensibili di poly[3-hexylthiophene] (P3HT). Il P3HT viene sintetizzato attraverso polimerizzazione ossidativa di 3-hexyl-thiophene con cloruro ferrico e appartiene alla classe dei polimeri coniugati, ovvero materiali polimerici caratterizzati da una catena principale (*backbone*) formata dalla successione ordinata di un legame semplice ed uno doppio. Tale configurazione conferisce ai polimeri coniugati proprietà ottiche ed elettroniche simili a quelle dei semiconduttori inorganici. Le nanoparticelle di P3HT hanno un diametro di circa 300nm con forma sferica o ellissoidale e sono in grado di legarsi alle cellule nervose senza essere endocitate (figura 104). Sotto la stimolazione luminosa si verifica un accumulo di cariche negative sulla superficie delle sfere, tale fenomeno risulta rinforzato se il P3HT viene drogato di tipo N con ossigeno. La membrana della cellula nervosa viene depolarizzata per l'effetto capacitivo prodotto all'interfaccia tra membrana e nanoparticella costituita da una fessura inferiore ai 20nm che presenta una resistenza elettrica di 10-100M Ω . La somma spaziale e temporale dei potenziali garantisce il superamento della soglia di attivazione delle cellule gangliari retinali con latenze superiori a quelle fisiologiche. L'impianto è minimamente invasivo e consiste nell'iniezione subretinale di una sospensione acquosa di nano particelle di P3HT. La sperimentazione sui ratti ha dimostrato come le nanoparticelle si distribuiscano su gran parte della retina esterna senza migrare verso gli stati interni garantendo la riattivazione della corteccia V1 e il recupero dei comportamenti legati alla visione (figura 105). Al momento non è in corso la sperimentazione sull'uomo [44].

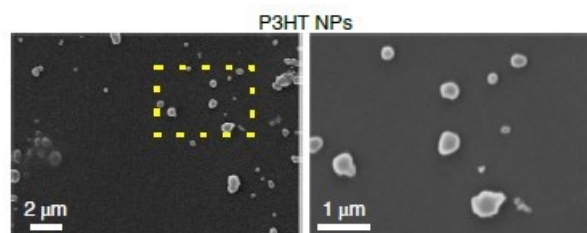


Figura 104. Nano particelle di P3HT al FEM [44].

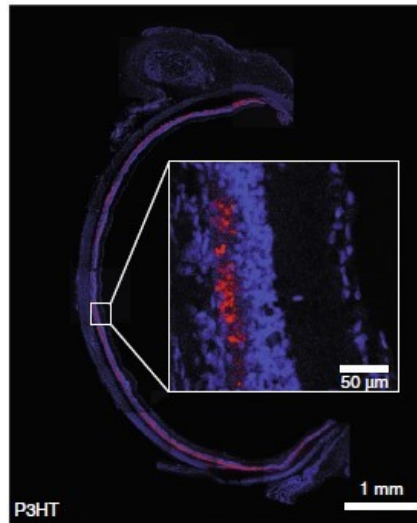


Figura 105. Ricostruzione della sezione equatoriale di una retina distrofica di ratto dopo l'iniezione di nanoparticelle di P3HT fluorescenti (puntini rossi), si nota come la diffusione avvenga solo nello spazio subretinale [44].

6. Considerazioni finali

Il sistema visivo è caratterizzato da una complessa anatomia e fisiologia, molteplici segnali bioelettrici consentono di valutarne lo stato e comprenderne il funzionamento. I segnali ERG, VEP e le bioimmagini retiniche permettono una diagnosi completa nel caso di determinate patologie. Il segnale EOG oltre a implicazioni cliniche è alla base delle *Human Computer Interface* che consentono ad individui affetti da patologie gravemente debilitanti di comunicare.

Uno degli obiettivi principali della ricerca scientifica in questo campo è ingegnerizzare protesi performanti che riescano a sostituire la via visiva nel caso sia danneggiata da particolari patologie. Al momento sono in via di sviluppo e test retine artificiali e impianti neurali. Mentre nel primo caso si cerca di sostituire la funzione dei fotorecettori, nel secondo caso viene provocata la percezione di mappe planari di fosfeni attraverso l'elettrostimolazione corticale. Il perfezionamento di tali ausili consentirà la realizzazione di impianti sempre meno invasivi e la percezione di risoluzioni spaziali sempre maggiori; inoltre lo studio dell'elettrostimolazione corticale porterà alla comprensione della percezione del colore e della distanza così da implementare una vera e propria visione artificiale.

7. Bibliografia

- [1] Lauralee Sherwood, *Fondamenti di fisiologia umana*, ed. Piccin, 2012.
- [2] D. U. Silverthorn, *Fisiologia umana un approccio integrato*, settima edizione, edizione italiana a cura di: Barbara Colombini, Carla Perego, Stefano Rufini, ed. Pearson, 2017.
- [3] C S McCaa. The eye and visual nervous system: anatomy, physiology and toxicology. *Environmental Health Perspectives*, 44:1–8, 1982. <https://doi.org/10.2307/3429469>.
- [4] Kandel et al., *Principi di Neuroscienze*, terza edizione, ed. CEA, 2003.
- [5] Mark F. Bear, Barry W. Connors, Michael A. Paradiso, *Neuroscienze*, quarta edizione, ed. Masson, 2016.
- [6] Satoru Kawamura and Shuji Tachibanaki. Molecular bases of rod and cone differences. *Progress in Retinal and Eye Research*, page 101040, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2021.101040>.
- [7] Euler, T., Haverkamp, S., Schubert, T. et al. Retinal bipolar cells: elementary building blocks of vision. *Nat Rev Neurosci* 15, 507–519 (2014). <https://doi.org/10.1038/nrn3783>.
- [8] Network Vista Fragile, ultimo accesso: 4 Aprile 2022. [Online]. <https://vistafragile.it/>.
- [9] Donnell J. Creel. Chapter 33 - the electrooculogram. In Kerry H. Levin and Patrick Chauvel, editors, *Clinical Neurophysiology: Basis and Technical Aspects*, volume 160 of *Handbook of Clinical Neurology*, pages 495–499. Elsevier, 2019. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64032-1.00033-3>.
- [10] IRCCS Fondazione G.B.Bietti per lo studio e la ricerca in oftalmologia ONLUS, ultimo accesso: 5 Aprile 2022. [Online]. <http://www.fondazionebietti.it/it>.
- [11] Gernot R. Müller-Putz. Chapter 18 - electroencephalography. In Nick F. Ramsey and José del R. Millán, editors, *Brain-Computer Interfaces*, volume 168 of *Handbook of Clinical Neurology*, pages 249–262. Elsevier, 2020. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63934-9.00018-4>.
- [12] Dottoressa Sabrina Brigadori, materiale di lezione del seminario su elettroencefalografia per il corso di Tecnologia e strumentazione biomedica a.a. 2020-21.
- [13] Odom, J.V., Bach, M., Brigell, M. et al. ISCEV standard for clinical visual evoked potentials: (2016 update). *Doc Ophthalmol* 133, 1–9 (2016). <https://doi.org/10.1007/s10633-016-9553-y>.

- [14] Donnell Joseph Creel. Chapter 34 - visually evoked potentials. In Kerry H. Levin and Patrick Chauvel, editors, *Clinical Neurophysiology: Basis and Technical Aspects*, volume 160 of *Handbook of Clinical Neurology*, pages 501–522. Elsevier, 2019. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64032-1.00034-5>.
- [15] Constable, P.A., Bach, M., Frishman, L.J. et al. ISCEV Standard for clinical electro-oculography (2017 update). *Doc Ophthalmol* 134, 1–9 (2017). <https://doi.org/10.1007/s10633-017-9573-2>.
- [16] R. Barea, L. Boquete, S. Ortega, E. López, and J.M. Rodríguez-Ascariz. Eog-based eye movements codification for human computer interaction. *Expert Systems with Applications*, 39(3):2677–2683, 2012. <https://doi.org/10.1007/s10633-017-9573-2>.
- [17] G. B. Arden, Adel Barrada, and J. H. Kelsey. New clinical test of retinal function based upon the standing potential of the eye. *British Journal of Ophthalmology*, 46(8):449–467, 1962. <https://dx.doi.org/10.1136%2Fbjjo.46.8.449>.
- [18] Robson, A.G., Frishman, L.J., Grigg, J. et al. ISCEV Standard for full-field clinical electroretinography (2022 update). *Doc Ophthalmol* 144, 165–177 (2022). <https://doi.org/10.1007/s10633-022-09872-0>.
- [19] Perlman I. The Electroretinogram: ERG. 2001 May 1 [Updated 2007 Jun 27]. In: Kolb H, Fernandez E, Nelson R, editors. *Webvision: The Organization of the Retina and Visual System* [Online]. Salt Lake City (UT): University of Utah Health Sciences Center; 1995. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK11554/>.
- [20] Diagnosys, Electrodes for clinical practice, ultimo accesso: 30 Marzo 2022. [Online]. <https://www.diagnosysllc.com/electrodes-for-clinical-practice/>.
- [21] Frishman, L., Sustar, M., Kremers, J. et al. ISCEV extended protocol for the photopic negative response (PhNR) of the full-field electroretinogram. *Doc Ophthalmol* 136, 207–211 (2018). <https://doi.org/10.1007/s10633-018-9638-x>.
- [22] Hoffmann, M.B., Bach, M., Kondo, M. et al. ISCEV standard for clinical multifocal electroretinography (mfERG) (2021 update). *Doc Ophthalmol* 142, 5–16 (2021). <https://doi.org/10.1007/s10633-020-09812-w>.
- [23] Hood, Donald C. PhD; Odel, Jeffrey G. MD; Chen, Candice S. MD; Winn, Bryan J. BA The Multifocal Electroretinogram, *Journal of Neuro-Ophthalmology*: September 2003 - Volume 23 - Issue 3 - p 225-235. https://journals.lww.com/jneuro-ophthalmology/Fulltext/2003/09000/The_Multifocal_Electroretinogram.00008.aspx.

- [24] Bach, M., Brigell, M.G., Hawlina, M. et al. ISCEV standard for clinical pattern electroretinography (PERG): 2012 update. *Doc Ophthalmol* 126, 1–7 (2013). <https://doi.org/10.1007/s10633-012-9353-y>.
- [25] Robson, A.G., Nilsson, J., Li, S. et al. ISCEV guide to visual electrodiagnostic procedures. *Doc Ophthalmol* 136, 1–26 (2018). <https://doi.org/10.1007/s10633-017-9621-y>.
- [26] Emily Dawn Cole, Eduardo Amorim Novais, Ricardo Noguera Louzada, and Nadia K Waheed. Contemporary retinal imaging techniques in diabetic retinopathy: a review. *Clinical & Experimental Ophthalmology*, 44(4):289–299, 2016. <https://doi.org/10.1111/ceo.12711>.
- [27] Pearse A. Keane and Srinivas R. Sadda. Retinal imaging in the twenty-first century: State of the art and future directions. *Ophthalmology*, 121(12):2489–2500, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.ophtha.2014.07.054>.
- [28] Wintergerst, Maximilian W.M. MD; Jansen, Linus G.; Holz, Frank G. MD; Finger, Robert P. PhD Smartphone-Based Fundus Imaging—Where Are We Now?, *Asia-Pacific Journal of Ophthalmology: July-August 2020 - Volume 9 - Issue 4 - p 308-314*. <http://doi.org/10.1097/APO.0000000000000303>.
- [29] W H Woon, F W Fitzke, A C Bird, and J Marshall. Confocal imaging of the fundus using a scanning laser ophthalmoscope. *British Journal of Ophthalmology*, 76(8):470–474, 1992. <http://dx.doi.org/10.1136/bjo.76.8.470>.
- [30] E. J. Donaldson. Fluorescein angiography. *Australian Journal of Ophthalmology*, 8(4):329–331, 1980. <https://doi.org/10.1111/j.1442-9071.1980.tb00294.x>.
- [31] S L Owens. Indocyanine green angiography. *British Journal of Ophthalmology*, 80(3):263–266, 1996. <http://dx.doi.org/10.1136/bjo.80.3.263>.
- [32] Steffen Schmitz-Valckenberg, Maximilian Pfau, Monika Fleckenstein, Giovanni Staurenghi, Janet R. Sparrow, Almut Bindewald-Wittich, Richard F. Spaide, Sebastian Wolf, Srinivas R. Sadda, and Frank G. Holz. Fundus autofluorescence imaging. *Progress in Retinal and Eye Research*, 81:100893, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2020.100893>.
- [33] Lisandro M Sakata, Julio DeLeon-Ortega, Viviane Sakata, and Christopher A Girkin. Optical coherence tomography of the retina and optic nerve – a review. *Clinical & Experimental Ophthalmology*, 37(1):90–99, 2009. <https://doi.org/10.1111/j.1442-9071.2009.02015.x>.
- [34] Huang D, Swanson EA, Lin CP, Schuman JS, Stinson WG, Chang W, Hee MR, Flotte T, Gregory K, Puliafito CA, et al. Optical coherence tomography. *Science*. 1991 Nov

- 22;254(5035):1178-81. <https://doi.org/10.1126/science.1957169>. PMID: 1957169; PMCID: PMC4638169.
- [35] de Carlo, T.E., Romano, A., Waheed, N.K. et al. A review of optical coherence tomography angiography (OCTA). *Int J Retin Vitreol* 1, 5 (2015). <https://doi.org/10.1186/s40942-015-0005-8>.
- [36] Jeffrey V Rosenfeld, Yan Tat Wong, Edwin Yan, Julian Szlawski, Anand Mohan, Jonathan Clark, Marcello Rosa, and Arthur Lowery. Tissue response to a chronically implantable wireless, intracortical visual prosthesis (gennaris array). *Journal of Neural Engineering*, jun 2020. <https://doi.org/10.1088/1741-2552/ab9e1c>.
- [37] Niketeghad, S., Pouratian, N. Brain Machine Interfaces for Vision Restoration: The Current State of Cortical Visual Prosthetics. *Neurotherapeutics* 16, 134–143 (2019). <https://doi.org/10.1007/s13311-018-0660-1>.
- [38] Bak, M., Girvin, J.P., Hambrecht, F.T. et al. Visual sensations produced by intracortical microstimulation of the human occipital cortex. *Med. Biol. Eng. Comput.* 28, 257–259 (1990). <https://doi.org/10.1007/BF02442682>.
- [39] Eduardo Fernández, Arantxa Alfaro, Cristina Soto-Sánchez, Pablo Gonzalez-Lopez, Antonio M. Lozano, Sebastian Peña, Maria Dolores Grima, Alfonso Rodil, Bernardeta Gómez, Xing Chen, Pieter R. Roelfsema, John D. Rolston, Tyler S. Davis, and Richard A. Normann. Visual percepts evoked with an intracortical 96-channel microelectrode array inserted in human occipital cortex. *The Journal of Clinical Investigation*, 131(23), 12 2021. <https://doi.org/10.1172/JCI151331>.
- [40] Lowery, A.J. et al. (2017). Monash Vision Group’s Gennaris Cortical Implant for Vision Restoration. In: Gabel, V. (eds) *Artificial Vision*. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-319-41876-6_17.
- [41] Yvonne Hsu-Lin Luo and Lyndon da Cruz. The argus® ii retinal prosthesis system. *Progress in Retinal and Eye Research*, 50:89–107, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2015.09.003>.
- [42] Nano Retina, ultimo accesso: 3 Maggio 2022. [Online]. <https://www.nano-retina.com/>.
- [43] Novavido, ultimo accesso: 3 maggio 2022. [Online]. <https://www.novavido.it/it/>.
- [44] Maya-Vetencourt, J.F., Manfredi, G., Mete, M. et al. Subretinally injected semiconducting polymer nanoparticles rescue vision in a rat model of retinal dystrophy. *Nat. Nanotechnol.* 15, 698–708 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41565-020-0696-3>.

