

PROGRAMMA DI RICERCA

Richiesta di un assegno di ricerca finanziato su fondi Alma Idea 2022 linea A

TUTOR: PROF. STEFANO BASTIANINI

DIP. SCIENZE BIOMEDICHE E NEUROMOTORIE

Titolo Progetto:

Stimolazione Optogenetica dei Nuclei dell'Ipoglosso per la Cura delle Apnee (SONICA)

Il progetto SONICA

L'apnea ostruttiva del sonno (**OSA**) è un disturbo respiratorio caratterizzato dalla parziale o totale occlusione delle vie aeree con conseguente riduzione della ossigenazione del sangue (calo di saturazione dell'emoglobina). Questa condizione, ampiamente diffusa nella popolazione generale (6-17%), si associa a frequenti risvegli notturni, frammentazione del sonno ed aumento del rischio cardiovascolare (PMID: 27583667). Tra le principali cause di OSA, ricopre un ruolo di rilievo la perdita di tonicità, durante il sonno, dei muscoli delle vie aeree superiori ed in particolare dei muscoli linguali. La lingua è un muscolo molto complesso e variegato ma il genioglosso (GG), il cui livello di contrazione è primariamente determinato dall'attività del XII nervo cranico (ipoglosso) ne rappresenta il principale componente. I corpi cellulari del nervo ipoglosso sono situati nel tronco dell'encefalo a livello dei nuclei dell'ipoglosso (PMID: 33574581). Il progetto di **Stimolazione Optogenetica dei Nuclei dell'Ipoglosso per la Cura delle Apnee (SONICA)**, finanziato tramite il bando Alma Idea 2022 promosso dall'Università di Bologna, si pone l'obiettivo di ottenere dati preliminari sulla possibilità di sviluppare nuovi micro-dispositivi ottici volti a modulare l'attività dei motoneuroni responsabili per la comparsa di OSA nel topo.

L'idea è dunque quella di modulare, tramite controllo optogenetico, l'attività di specifiche popolazioni neurali geneticamente modificate per esprimere recettori fotosensibili e di legare tale attivazione alle reali esigenze dell'organismo (livello di saturazione ematica).

Obiettivi SONICA

Il progetto SONICA, in questa fase preliminare, si avvarrà della stretta collaborazione interdisciplinare tra fisiologi del sonno ed ingeneri delle radiofrequenze con i seguenti specifici obiettivi:

- studio e analisi dell'architettura di un micro-dispositivo, impiantabile nel topo, in grado di emettere luce. Il dispositivo non includerà una batteria ma un sottosistema wireless di ricezione ed accumulo dell'energia necessaria a supportare l'attività del micro-dispositivo. Per ridurre i consumi, il dispositivo si troverà normalmente spento e verrà attivato attraverso lo stesso sistema wireless che potrà essere comandato anche dal segnale di allarme fornito dal saturimetro (si veda sotto).
- studio e analisi dell'architettura di un secondo micro-dispositivo a batteria, impiantabile nel topo, per la rilevazione continua della saturazione dell'emoglobina ed in grado di attivare dispositivo precedente.
- validazione di un protocollo per la trasfezione, in vivo nel topo, dei nuclei dell'ipoglosso con plasmidi contenenti le informazioni genetiche per l'espressione di recettori fotosensibili.

Metodologia del progetto e piano di attività dell'assegnista

SONICA si pone l'obiettivo di modulare, tramite controllo optogenetico, l'attività dei nuclei dell'ipoglosso in topi geneticamente modificati per esprimere recettori fotosensibili e di legare tale attivazione alle reali esigenze dell'organismo (livello di

saturazione ematica). SONICA avrà dunque, in questa fase preliminare, il duplice obiettivo di:

- AIM1: studiare e concettualizzare lo sviluppo di micro-dispositivi (1 di stimolazione ottica e l'altro di rilevazione della saturazione ematica) impiantabili e con capacità di funzionamento combinata ed autonoma;
- AIM2: validare il protocollo per la creazione di topi transgenici in grado di esprimere recettori fotosensibili nei nuclei dell'ipoglosso.

Per raggiungere tali obiettivi, SONICA si comporrà di 2 parti sperimentali (EXP1 e EXP2) supervisionate rispettivamente dalla Prof.ssa Costanzo (EXP1) e dal Prof. Bastianini (EXP2) avvalendosi dell'aiuto di un assegnista di ricerca. L'assegnista verrà dunque coinvolto/a in tutti gli aspetti del progetto SONICA poiché collaborerà alla parte progettuale relativa allo sviluppo dei micro-dispositivi impiantabili e, al contempo, si occuperà del perfezionamento e validazione del modello murino.

I 2 esperimenti verranno svolti come riportato di seguito.

EXP1: progettazione di micro-dispositivi impiantabili.

In questa fase sperimentale la Prof.ssa Costanzo e l'assegnista si dedicheranno alla progettazione hardware di 2 micro-dispositivi.

Nello specifico verrà studiato l'architettura di un sistema contenente un dispositivo ottico (come ad esempio un μ Led) attivato tramite energia Elettromagnetica trasferita senza fili, mediante tecniche di "wireless power transfer" /WPT), simili alla tecnologia presentata in (PMID: 33972800). Si utilizzeranno funzioni di gestione dei segnali wireless in modo da consentire l'attivazione del dispositivo e la lettura dei bio-segnali a divisione di tempo, al fine di superare le difficoltà di precedenti approcci precedenti in cui la coesistenza delle due operazioni ha compromesso la lettura dei segnali. Il risultato di questa fase consentirà di dimensionare il sistema: verranno stabiliti i) i livelli di energia necessari ad accendere il μ Led (in grado di emettere luce ad una lunghezza d'onda di 470 nm); ii) i componenti per la ricezione di tali livelli, come l'interfaccia

wireless (antenna/coil) il rettificatore ed il dispositivo per l'accumulo dell'energia ricevuta. Tali scelte verranno fatte considerando diverse frequenze di funzionamento per il miglior compromesso tra massima efficienza di trasmissione dell'energia e minimo ingombro del sistema. Inoltre, verranno studiate le fasi di lavoro dell'intero sistema per consentire lo scambio dei segnali con il saturimetro. Tale attività verrà svolta utilizzando strumenti CAD di co-simulazione Elettromagnetica e non lineare. Inoltre, si analizzeranno materiali biocompatibili che potranno contenere il dispositivo in modo da essere impiantato sottocute e collegato alle fibre ottiche.

Il secondo dispositivo verrà sviluppato basandosi su un saturimetro wireless tissutale validato per il ratto (PMID: 30873435). In questo caso, si procederà alla progettazione dell'architettura di un dispositivo ulteriormente miniaturizzato ed applicabile attorno ad un grande vaso arterioso (carotide o femorale) nel topo. Questo saturimetro dovrà essere composto da (i) un circuito di optoelettronica su microscala per il rilevamento continuo della dinamica dell'emoglobina e (ii) circuiti per l'erogazione di energia (tramite minibatteria) e l'output di dati continui.

L'EXP1 permetterà di sviluppare il background teorico sull'utilizzo e la miniaturizzazione di strategie di raccolta di energia wireless basate su radiofrequenze e schemi di comunicazione di dati wireless. Queste informazioni ed i progetti sviluppati dall'EXP1 consentiranno di dimostrare la fattibilità, ed i costi, dell'implementazione di impianti sottocutanei di ossimetria e di optogenetica per studi su modelli animali senza interruzioni dei comportamenti naturali. Lo sviluppo temporale di questa parte del progetto occuperà l'assegnista per 7 mesi/persona.

EXP2: validazione del protocollo per la creazione di topi transgenici per stimolazione optogenetica.

EXP2 prevedendo l'utilizzo di animali, potrà iniziare solo dopo l'approvazione della specifica autorizzazione etica (ragionevolmente dopo 3 mesi dall'inizio del progetto).

In 6 topi wild-type adulti verrà iniettato nel muscolo linguale un vettore virale (adeno-associato, AAV) per la trasfezione retrograda delle informazioni genetiche per esprimere recettori fotosensibili (Channel-Rodopsina, ChR2) nei nuclei dell'ipoglosso. Seguendo un protocollo, già validato, di iniezione linguale per la trasfezione retrograda (PMID: 30487776), nel presente progetto, i topi verranno anestetizzati (Isoflurano 2% in O₂) e il virus verrà iniettato nel segmento dorso-caudale della lingua (5 microlitri ogni lato della lingua). Il vettore virale conterrà, oltre a ChR2, un promotore specifico per cellule nervose (hSYN1) ed un gene reporter di fluorescenza (EYFP).

Dopo 4 settimane, i topi saranno sacrificati ed i cervelli perfusi e crioprotetti. L'area tronco-encefalica verrà sezionata in fettine di 30 micrometri colorate poi con ematossilina-eosina. Infine, nelle aree di interesse (nuclei dell'ipoglosso) verrà valutata la presenza di fluorescenza (EYFP) tramite microscopio a fluorescenza.

L'obiettivo di EXP2 è quella di confermare la selettiva presenza e di quantificare la fluorescenza nell'area di interesse e, tramite questa, di validare la tecnica di iniezione e trasfezione optogenetica retrograda.

Il prof. Bastianini si occuperà dell'esecuzione delle parti sperimentali dell'EXP2 ma sarà affiancato, sia per le parti in vivo che per quelle istologiche ex vivo, dall'assegnista di ricerca. Lo sviluppo temporale di questa parte del progetto occuperà l'assegnista per 5 mesi/persona.

PROGRAMMA DI FORMAZIONE DELL'ASSEGNISTA

Richiesta di un assegno di ricerca finanziato su fondi Alma Idea 2022 linea A

TUTOR: PROF. STEFANO BASTIANINI

DIP. SCIENZE BIOMEDICHE E NEUROMOTORIE

Titolo

Stimolazione Optogenetica dei Nuclei dell'Ipoglosso per la Cura delle Apnee (SONICA)

Piano di attività e formazione dell'Assegnista

Il o la titolare dell'assegno sarà costantemente supervisionato/a dal Co-PI del progetto Alma Idea, Prof.ssa Alessandra Costanzo, e sarà prevalentemente coinvolto/a nelle seguenti attività:

- studio e analisi dell'architettura di un micro-dispositivo, impiantabile nel topo, in grado di emettere luce. Il dispositivo non includerà una batteria ma un sottosistema wireless di ricezione ed accumulo dell'energia necessaria a supportare l'attività del micro-dispositivo. Per ridurre i consumi il dispositivo si troverà normalmente spento e verrà attivato, attraverso lo stesso sistema wireless dall'eventuale segnale di allarme fornito dal saturimetro (si veda sotto).
- studio e analisi dell'architettura di un secondo micro-dispositivo a batteria, impiantabile nel topo, per la rilevazione continua della saturazione dell'emoglobina ed in grado di inviare tale segnale al dispositivo precedente.

Tali attività si svolgeranno primariamente presso il Dipartimento di Ingegneria dell'Energia Elettrica e dell'Informazione "Guglielmo Marconi".

Il/la titolare dell'assegno sarà inoltre coinvolto/a nella validazione di un protocollo per la trasfezione, in vivo nel topo, dei nuclei dell'ipoglosso con plasmidi contenenti le informazioni genetiche per l'espressione di recettori fotosensibili. Questa parte dell'esperimento verrà principalmente supervisionata dal Prof. Stefano Bastianini e sarà

svolta presso i laboratori della sede di Fisiologia (Dipartimento di Scienze Biomediche e Neuromotorie).

Il laboratorio della Prof.ssa Costanzo è in grado di fornire al/alla titolare dell'assegno una formazione completa e personalizzata nel campo dei circuiti e sistemi per la trasmissione di energia senza fili che sarà utile allo studio e progettazione dei dispositivi sopra-elencati. D'altra parte, il laboratorio del Prof. Bastianini è totalmente equipaggiato per svolgere la parte in vivo di questo studio e potrà coinvolgere in maniera attiva il/la titolare dell'assegno sia sugli aspetti pratici che teorici relativi alla fisiopatologia delle apnee ostruttive del sonno che sullo sviluppo di modelli murini geneticamente modificati.

Il/la titolare parteciperà a riunioni interne periodiche con il Pi, il Co-PI ed i membri dello staff dei laboratori per la programmazione delle attività e l'analisi dei risultati ottenuti. Al termine dell'attività il/la titolare terrà un seminario per l'esposizione dei risultati conseguiti. Il/La titolare avrà modo di partecipare a congressi nazionali ed internazionali sul sonno e le neuroscienze (ad es., Società Italiana di Fisiologia, Società Italiana di Neuroscienze, Società Italiana di Neurologia, Associazione Italiana di Medicina del Sonno, European Sleep Research Society, Federation of European Neuroscience Societies) o su sistemi e circuiti a radiofrequenza, come la IEEE WPTCE (Wireless Power technology Conference and Expo) , nell'ambito di WPW (Wireless Power Week), la EUMW (European Microwave Week).