



Dibris



Dibris

ORGANOI³D

ORGANic charge modulated fet-based system for Optimized In vitro 3D electrophysiology

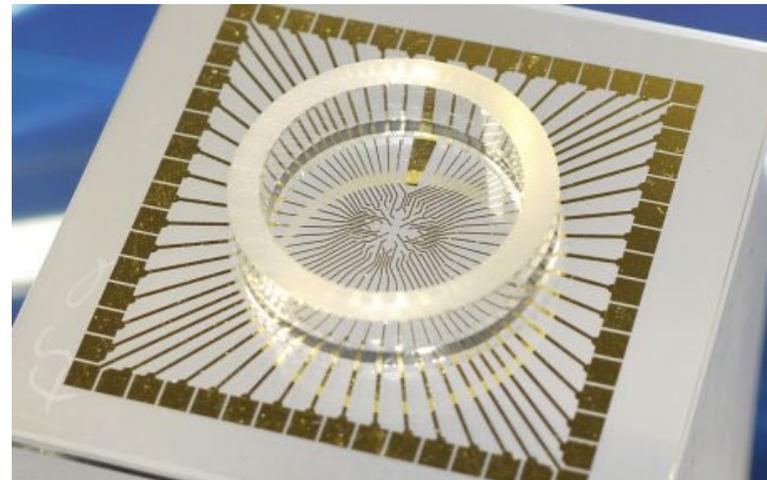
Bando per la realizzazione di programmi di valorizzazione dei brevetti tramite il finanziamento di progetti Proof of Concept (PoC) – BUYT

Elettrofisiologia in vitro

La tecnologia di riferimento in questo ambito è quella a film sottile su substrati rigidi (vetro-silicio). Il dispositivo maggiormente utilizzato viene chiamato Micro Electrode Array (MEA).

I MEA sono matrici di 60-200 microelettrodi che permettono la rilevazione e la stimolazione dell'attività elettrica di colture cellulari.

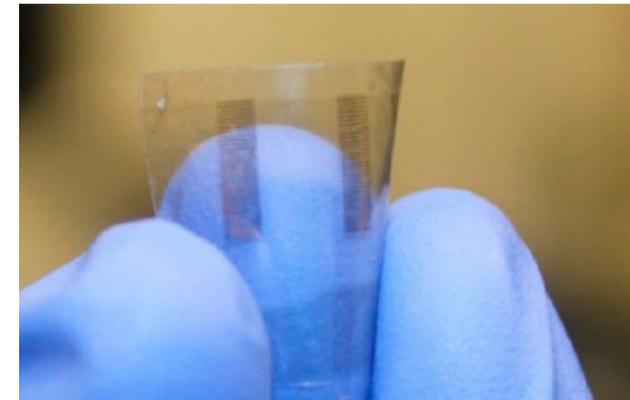
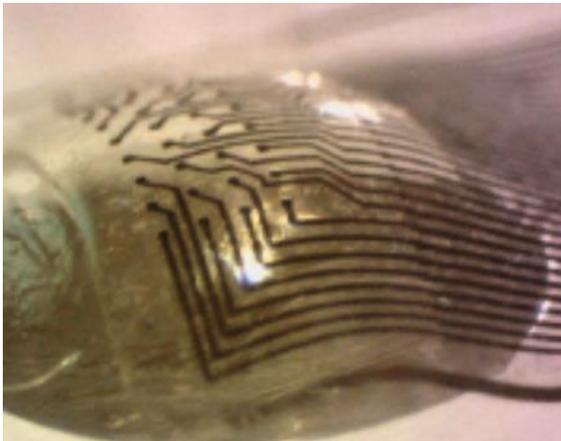
- Interesse scientifico: l'elettrofisiologia in vitro è impiegata in diversi campi scientifici come la **farmacologia**, la **tossicologia**, i **brain-on-a-chip**, la **medicina personalizzata** e le **interfacce cervello-macchina**.
- Interesse industriale: la Harvard Bioscience ha acquisito per **9.5 milioni di dollari** la Multichannel Systems nel 2014, azienda leader mondiale nel settore.



L'OCMFET per applicazioni cellulari: il Micro OCMFET Array

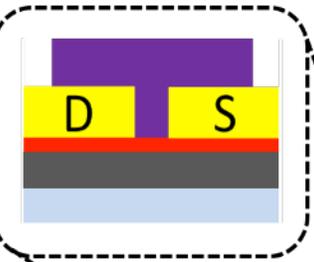
Rispetto ai dispositivi tradizionali introdotti negli anni '80 e commercializzati alla fine degli anni '90, **l'invenzione brevettata (PCT/EP2016/052433)** ha introdotto diverse idee e avanzamenti, grazie all'utilizzo di dispositivi attivi chiamati Organic Charge Modulated FET (**OCMFET**) e di tecniche e materiali propri dell'**elettronica organica**, in particolare:

- Processi di fabbricazione a **basso costo** e compatibilità con **materiali plastici, trasparenti e flessibili**
- Nessun elettrodo di riferimento esterno e amplificazione diretta del segnale
- Possibilità di **integrazione sullo stesso substrato di diversi tipi di sensori** (come sensori di pH per il monitoraggio dell'attività metabolica cellulare).

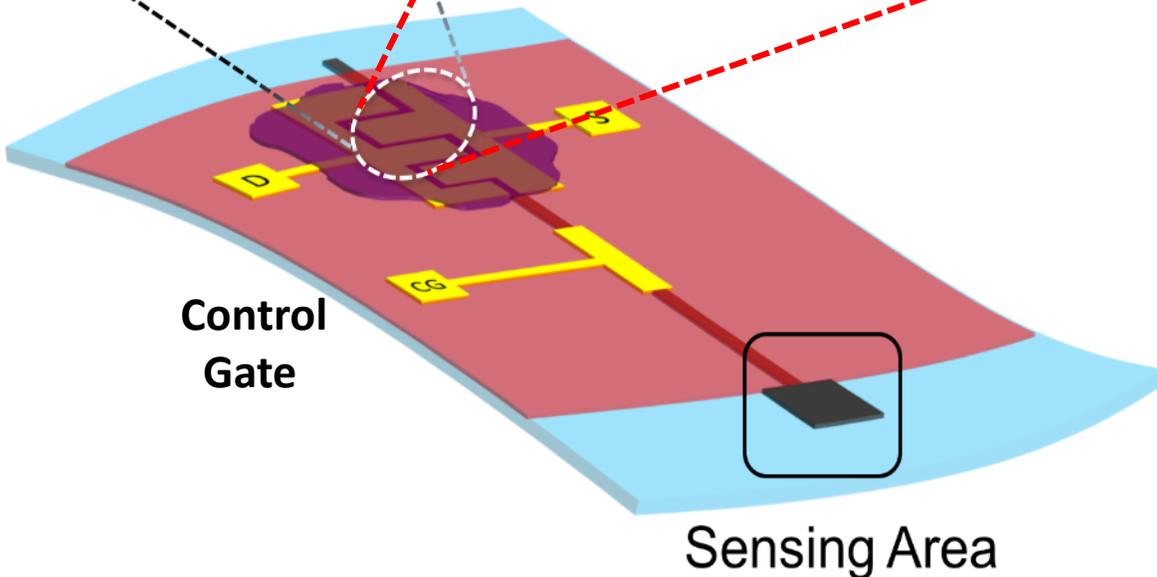
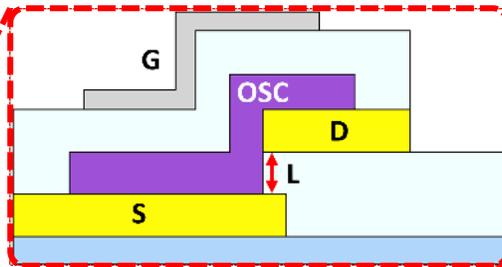


L'OCMFET per applicazioni cellulari: il Micro OCMFET Array

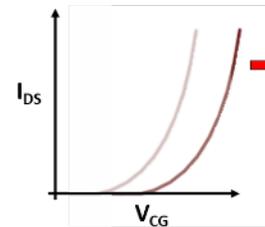
Coplanar OTFT



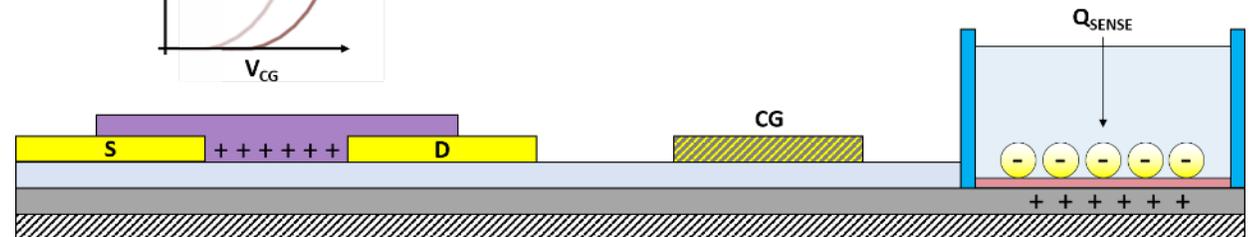
Vertical-channel OTFT



- Dispositivo a doppio gate (nessuna necessità di un elettrodo di riferimento esterno)
- Compatibile con substrati flessibili, economici e trasparenti
- Area di registrazione separata da quella del semiconduttore organico
- **Principio di trasduzione versatile**



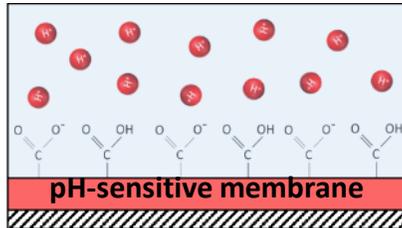
$$\Delta V_{TH} = - \frac{\Delta Q_{SENSE}}{C_{TOT}}$$



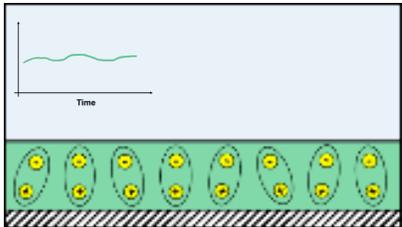
L'OCMFET per applicazioni cellulari: il Micro OCMFET Array

Monitoraggio multiparametrico di cellule elettro-attive in vitro

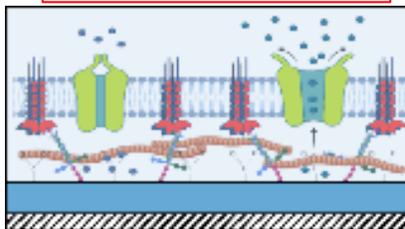
Attività metabolica



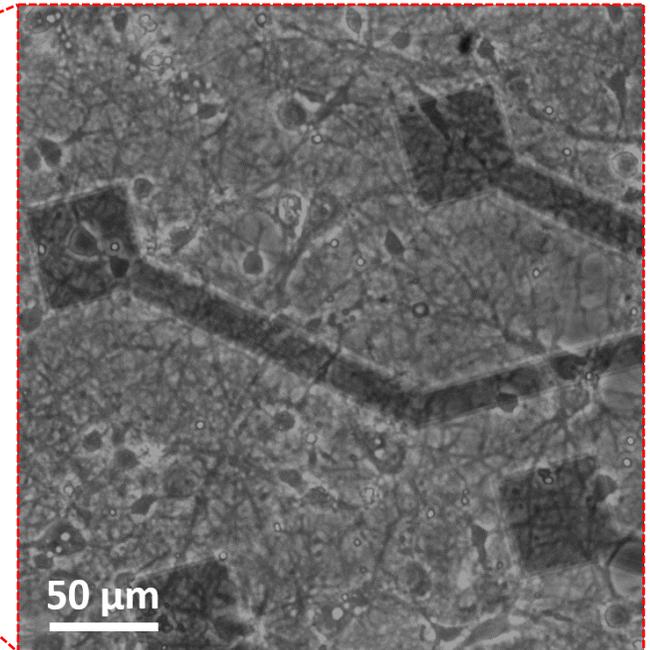
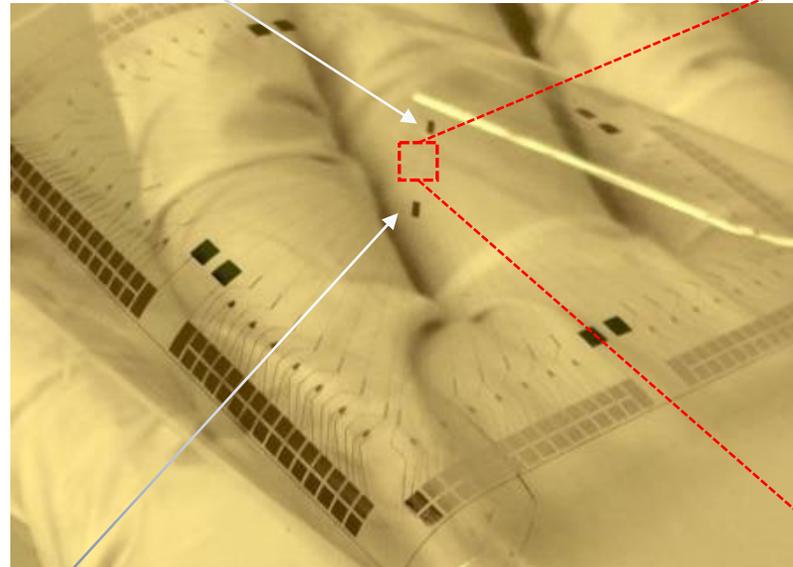
Parametri fisici



Rilevazione di Biomolecole

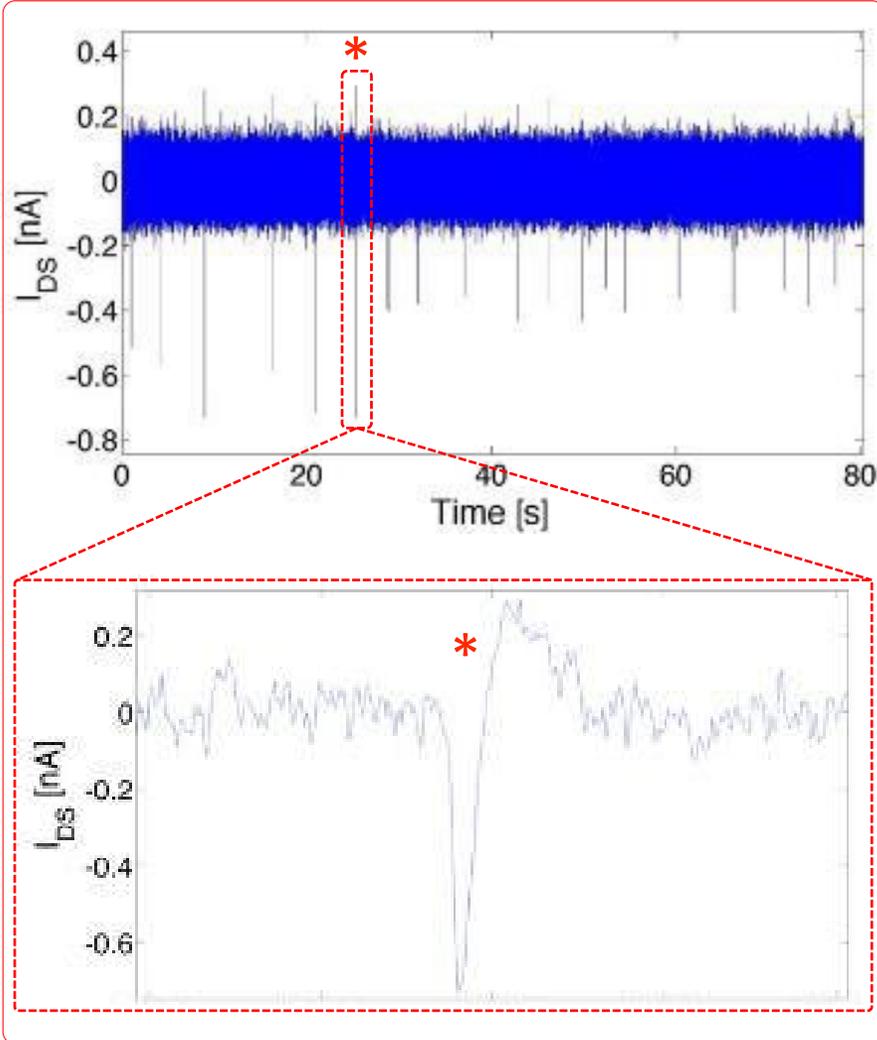


Attività elettrica

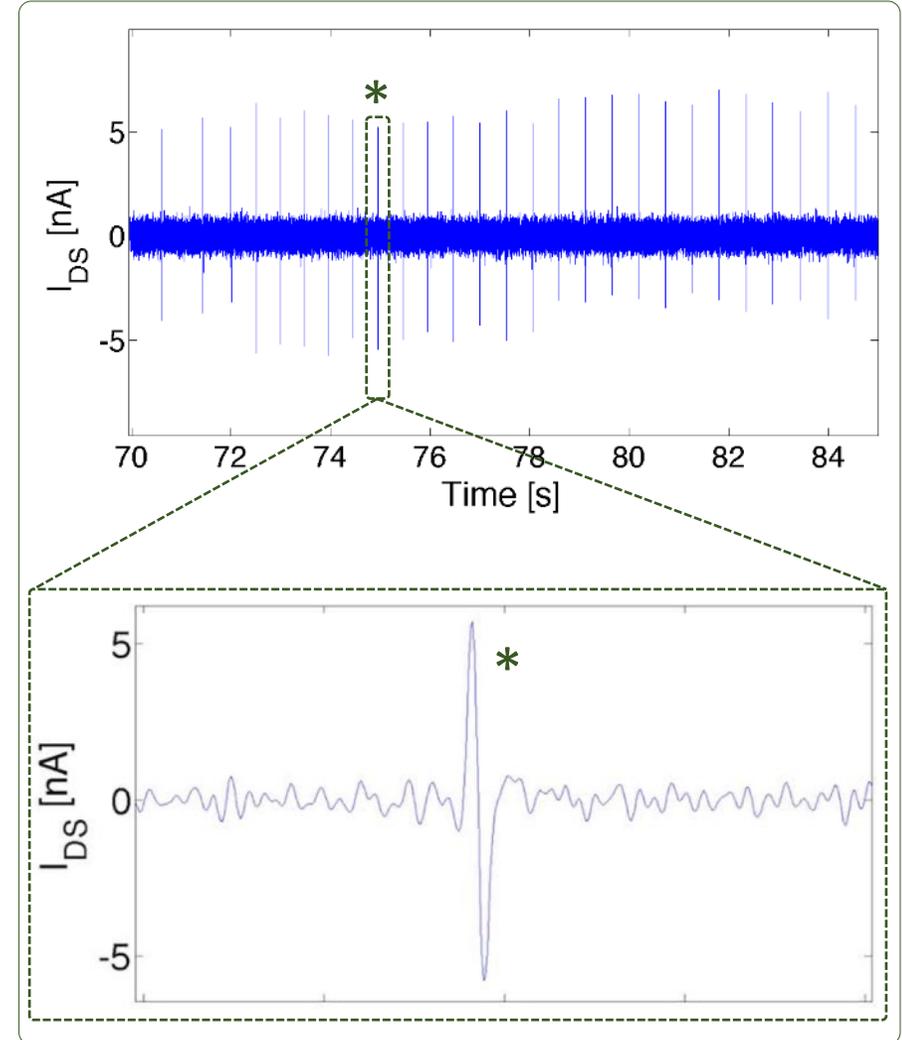


L'OCMFET per applicazioni cellulari: il Micro OCMFET Array

Neuroni ippocampali di ratto



Cardiomiociti di ratto



L'OCMFET per applicazioni cellulari: il Micro OCMFET Array

Il **monitoraggio dell'attività metabolica** cellulare è una pratica molto utilizzata nelle applicazioni in vitro. Uno dei modi per poterla monitorare consiste nella **misura del pH del mezzo cellulare**, il quale varia in base a cambiamenti dello stato metabolico delle cellule stesse.

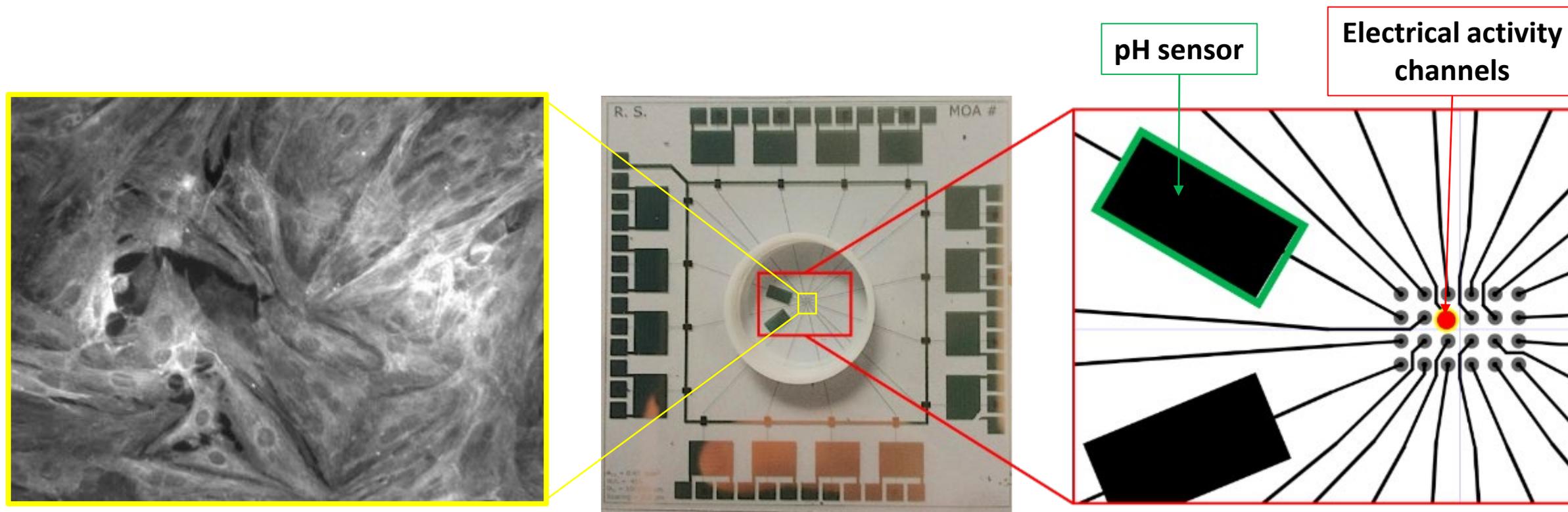
Farmacologia

Ingegneria tissutale

Valutazione della vitalità cellulare

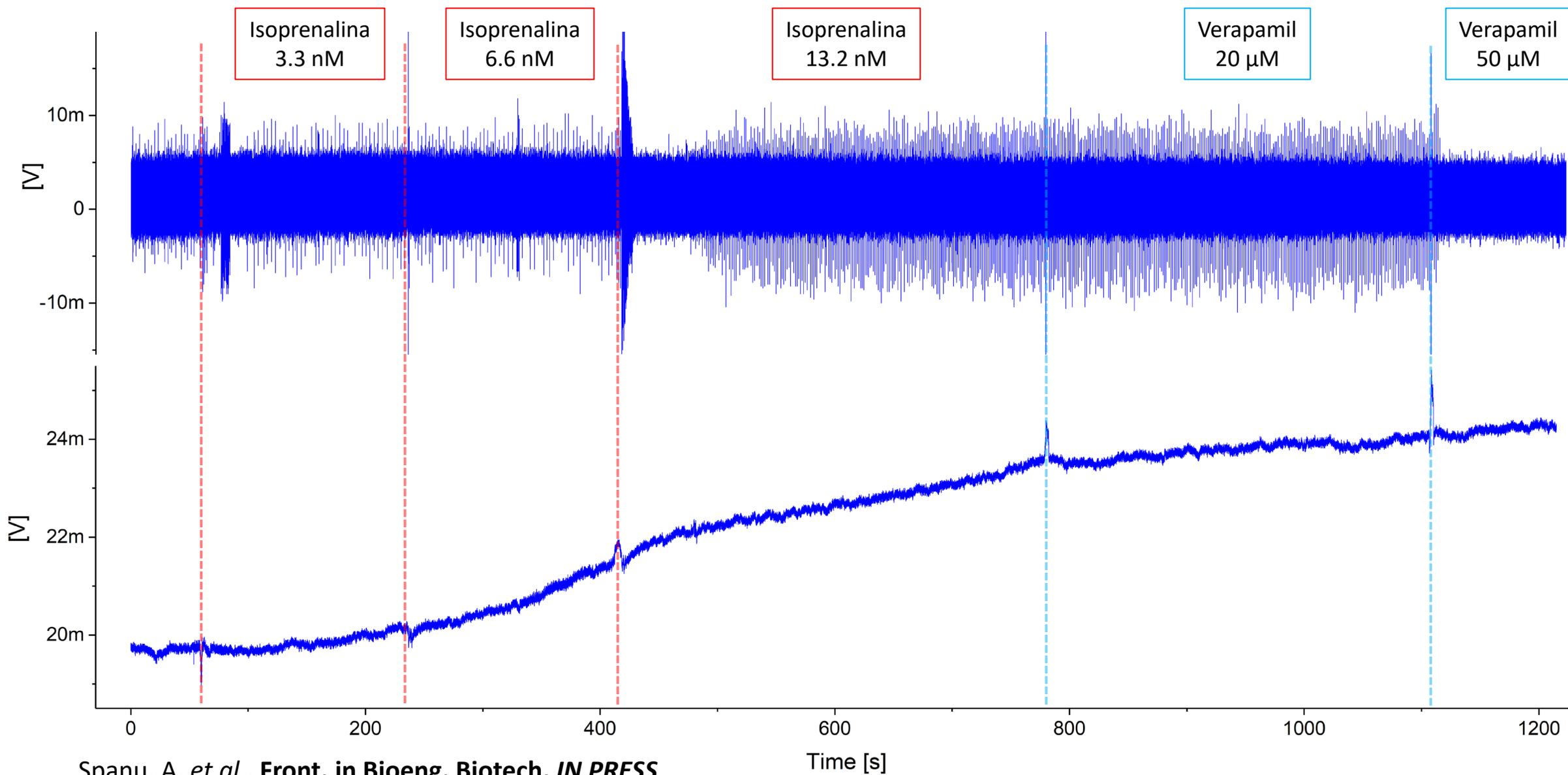


L'OCMFET per applicazioni cellulari: il Micro OCMFET Array



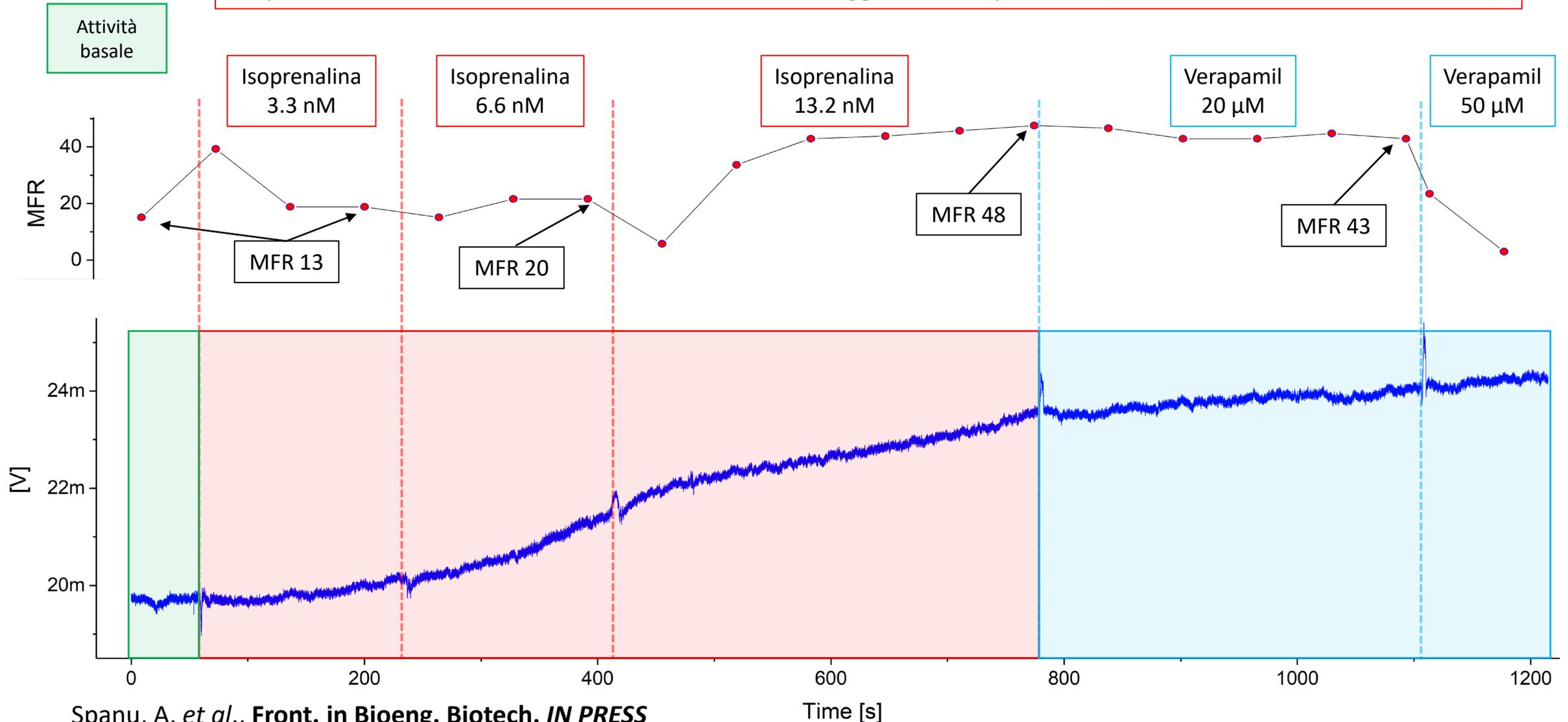
- **Simultaneous** metabolic and electrical recordings from a primary culture of **rat cardiomyocytes**
- Different metabolic states induced by the addition of different doses of **Isoprenaline** (a beta agonist that acts as a cardio stimulant) and **Verapamil** (blocks the voltage-dependent calcium channels' activity)

L'OCMFET per applicazioni cellulari: il Micro OCMFET Array



L'OCMFET per applicazioni cellulari: il Micro OCMFET Array

Rapida variazione dell'attività metabolica indotta dall'aggiunta di Isoprenalina (aumento del rate di acidificazione)



L'importanza della terza dimensione

Diversa morfologia

Diversa dinamica della rete

Differente risposta ai farmaci



SHARE

This special feature is brought to you by the [Science/AAAS Custom Publishing Office](#)



27



120

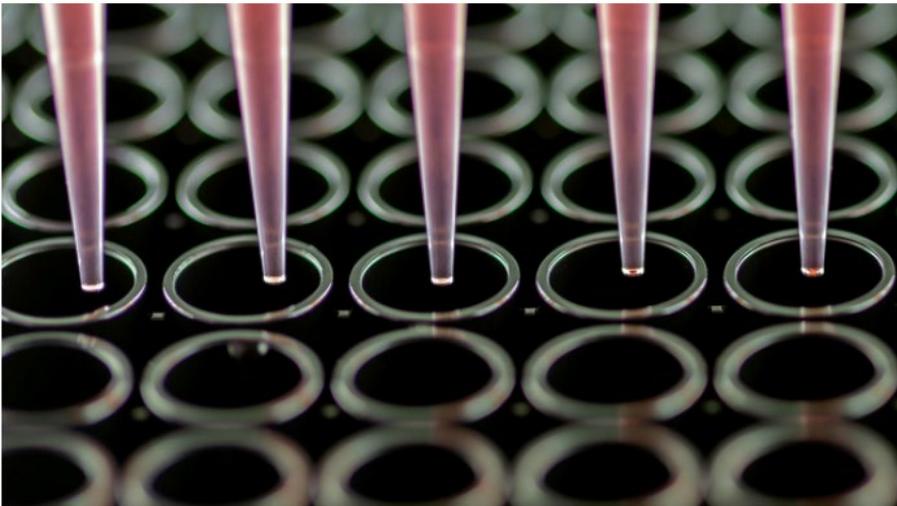


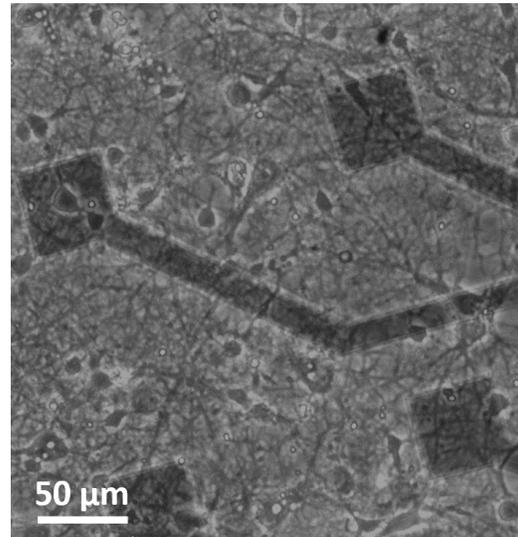
PHOTO: HAKAT/SHUTTERSTOCK.COM

TECHNOLOGY FEATURE

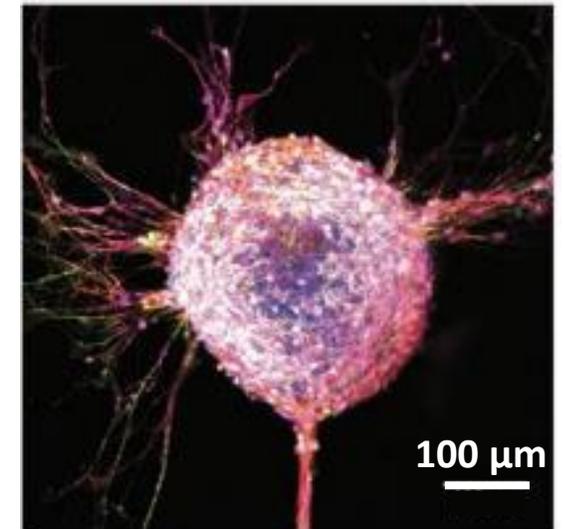
Adding depth to cell culture

By Kendall Powell | Apr. 7, 2017, 8:00 AM

Culture planari

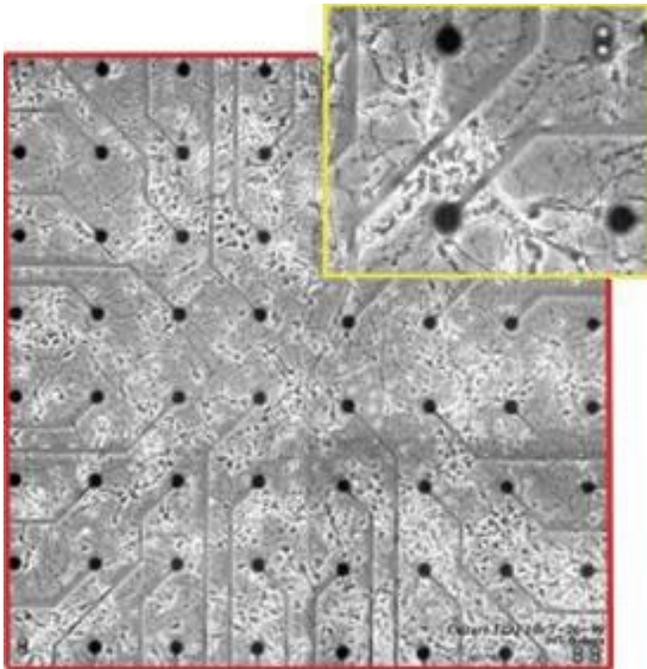


- Culture 3D ingegnerizzate
- Sferoidi ottenuti da cellule staminali



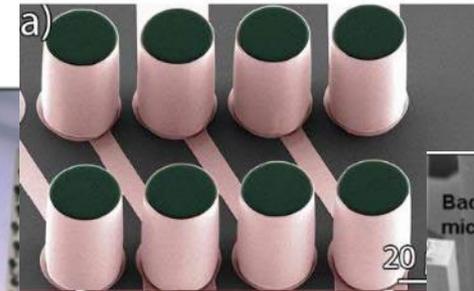
L'importanza della terza dimensione

2D "comfort zone"

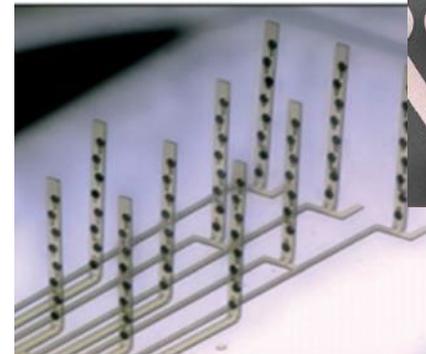
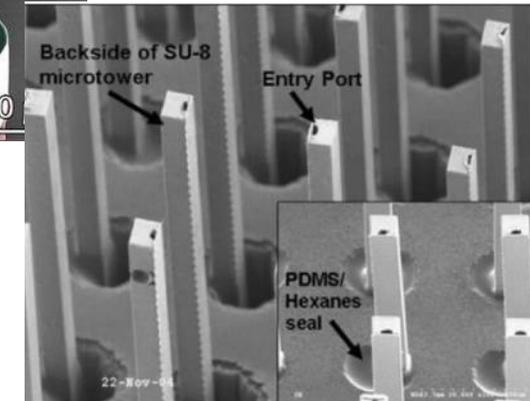


3D madness

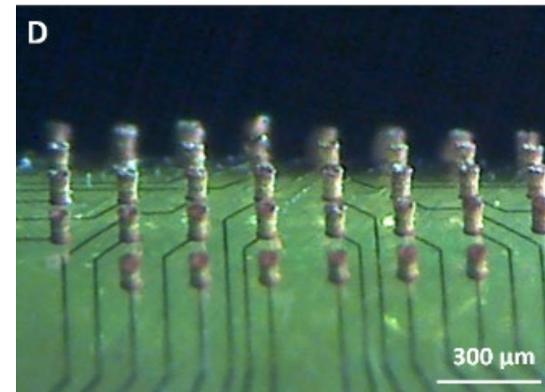
Kilchenmann, S. C. et al (2016)



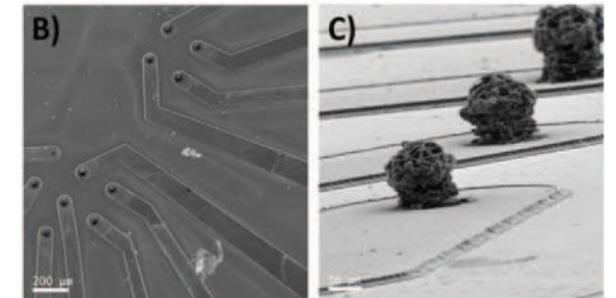
Rowe, L. et al. (2007)



Soscia, D. A. et al. (2020)

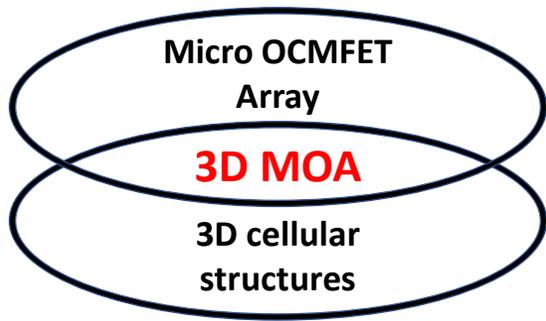


Spanu, A. et al. (2020)



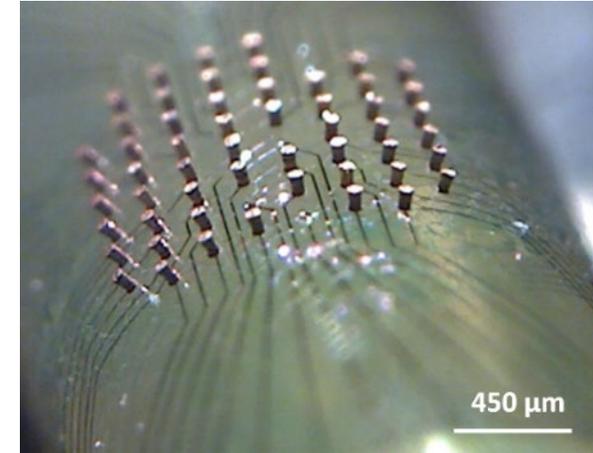
Fang, S.-P. et al. (2016)

Problematiche: forma, dimensioni, materiali, semplicità e scalabilità della tecnica di fabbricazione...



Il progetto ORGANOI^{3D}

Con il progetto ORGANOI^{3D} proponiamo un sostanziale avanzamento della tecnologia già brevettata, grazie **all'integrazione di elettrodi 3D** e ad un maggior numero di siti di registrazione in modo da essere competitivi con i più comuni MEA esistenti in commercio. Il dispositivo introdotto prende il nome di **MOA** (Micro OCMFET Array). Gli avanzamenti proposti sono supportati dalla riconosciuta esperienza dei proponenti in materia di realizzazione di dispositivi 3D, sia su substrati standard che su substrati plastici, flessibili e trasparenti [1,2].



	ORGANOI ^{3D}	MEA standard	MEA 3D	MOA
Flessibilità	+	+	-/+	+
Nessun elettrodo di riferimento esterno	+	-	-	+
Integrazione di elettrodi 3D	+	-	+	-
Dispositivi attivi	+	-	-	+

- Lorenzelli, L., Spanu, A., Pedrotti, S., Tedesco, M., & Martinoia, S. (2019, June). Three-Dimensional Microelectrodes Array Based on Vertically Stacked Beads For Mapping Neurons' Electrophysiological Activity. In *2019 20th International Conference on Solid-State Sensors, Actuators and Microsystems & Eurosensors XXXIII (TRANSDUCERS & EUROSENSORS XXXIII)* (pp. 987-990). IEEE.
- Spanu, A., Colistra, N., Farisello, P., Friz, A., Arellano, N., Rettner, C. T., Boniglio A., Bozano L. & Martinoia, S. (2020). A three-dimensional micro-electrode array for in-vitro neuronal interfacing. *Journal of Neural Engineering*.

Il progetto ORGANOI³D

Profilo	Durata Borsa	Budget stanziato (tot 25k)	Mansione
Ing. Elettronico/bioingegnere	9 mesi	17,5k	Fabbricazione dispositivi/progettazione dell'elettronica di lettura
Bioingegnere/biologo	4 mesi	7,5k	Gestione colture cellulari/misure elettrofisiologiche

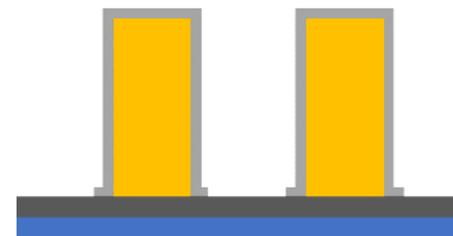
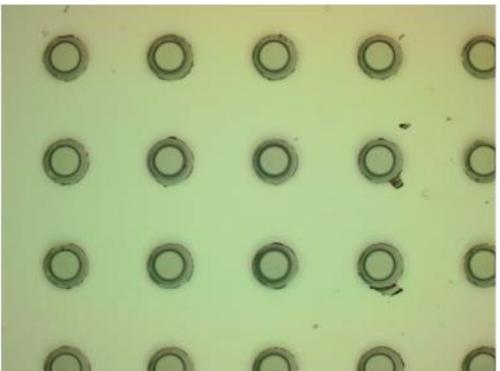
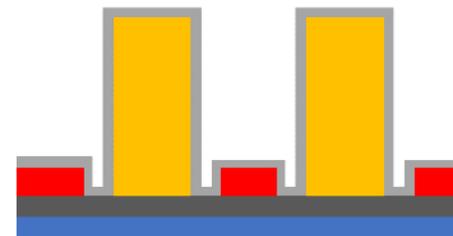
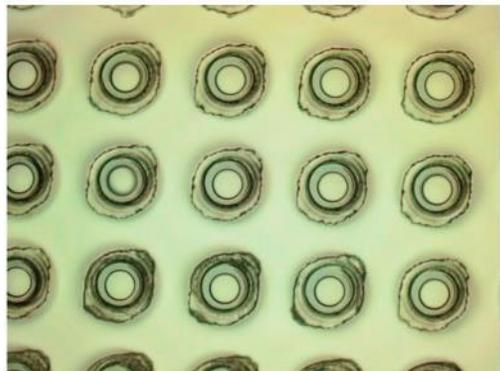
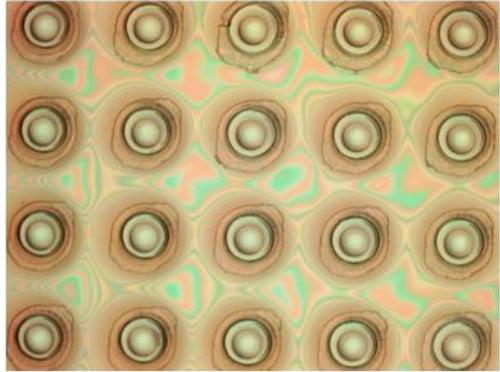
Laboratori e Facilities

- **DIBRIS:** Lab di Meccatronica (progettazione elettronica, testing), Lab di Neuroingegneria e Neurotecnologie (test cellulari)
- **DEAlab@UNICA:** prototipazione e test dispositivi

È prevista una collaborazione con **FBK (BioMems Lab)** per prototipizzazione dispositivi.

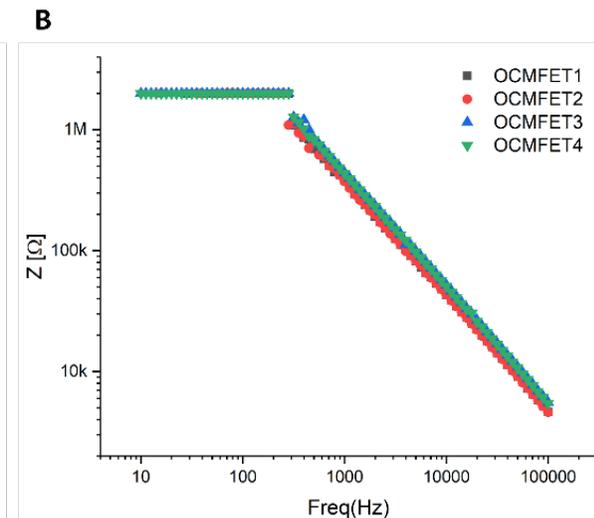
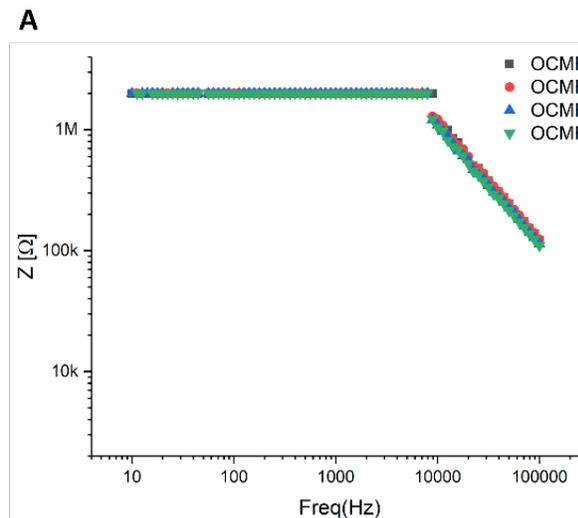
È inoltre prevista una (pre)validazione in collaborazione con **3Brain** (azienda che opera in ambito tecnologico per dispositivi e sistemi per elettrofisiologia) e con **SCREENNEUROPHARMA** (spin-off UNIGE per la parte applicativa)

Il progetto ORGANOI³D



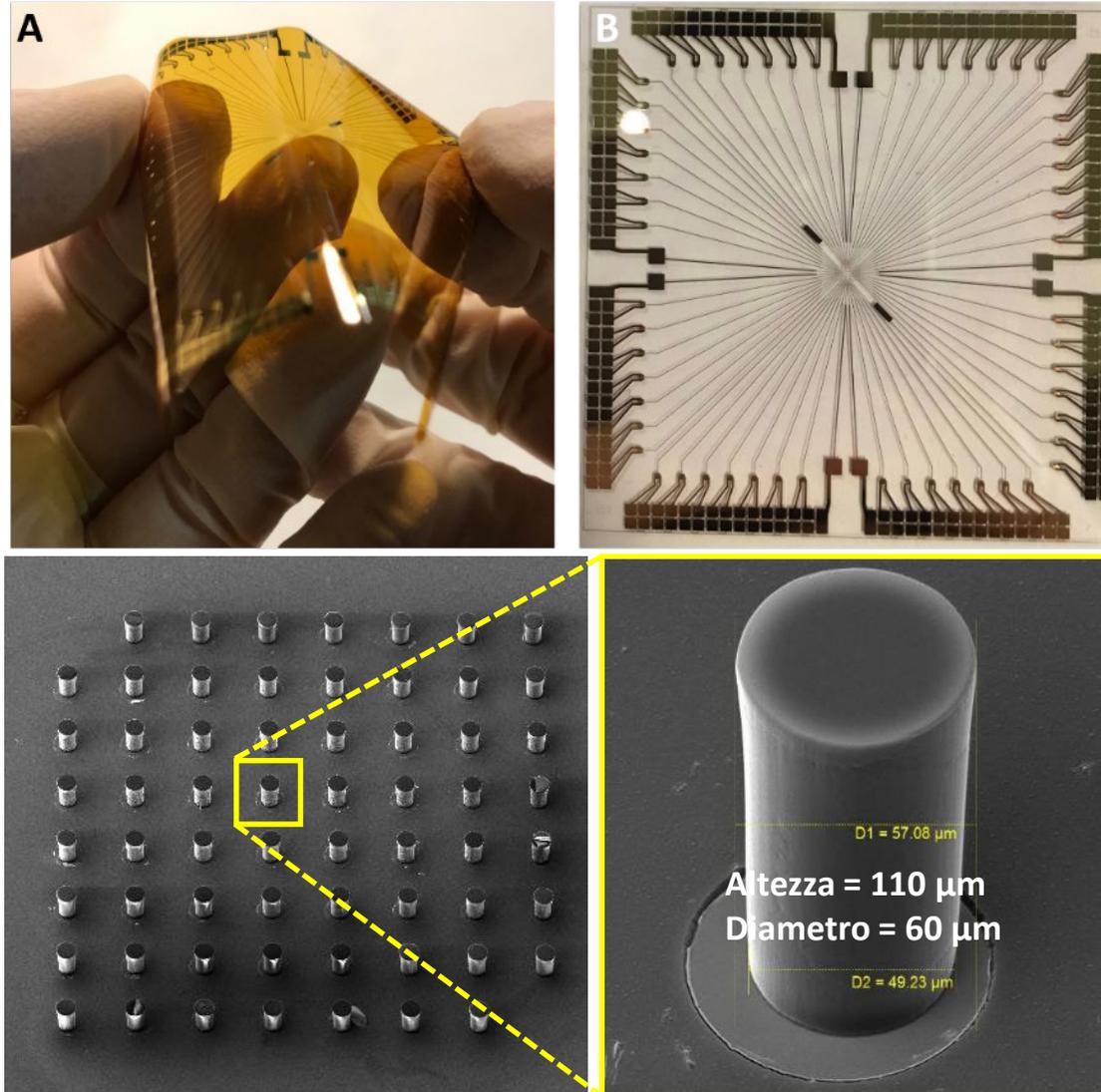
Nuovo processo di fabbricazione messo a punto nel progetto:

- Realizzazione di pillar passivi in KMPR sulle aree sensibili dei transistor e successiva deposizione e patterning di un layer sacrificale di photoresist attorno ai pillar
- Metallizzazione dei pillar
- Lift off del photoresist
- Passivazione con Parylene C e rimozione selettiva della passivazione dalla cima (RIE)



Il progetto ORGANOI³D

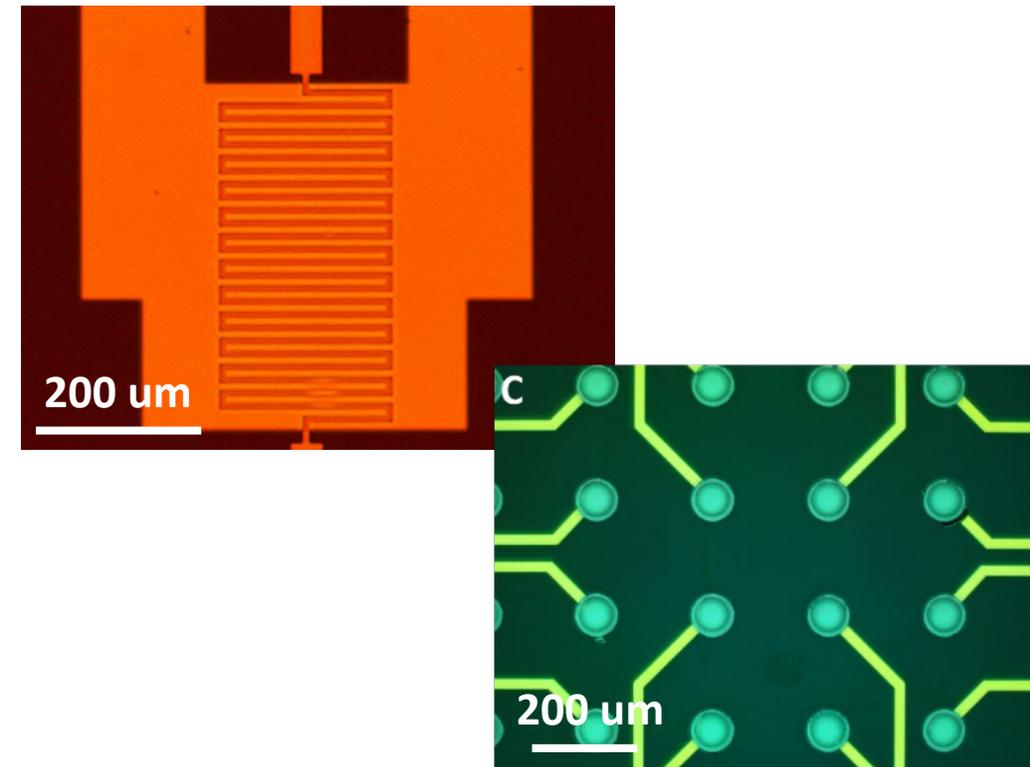
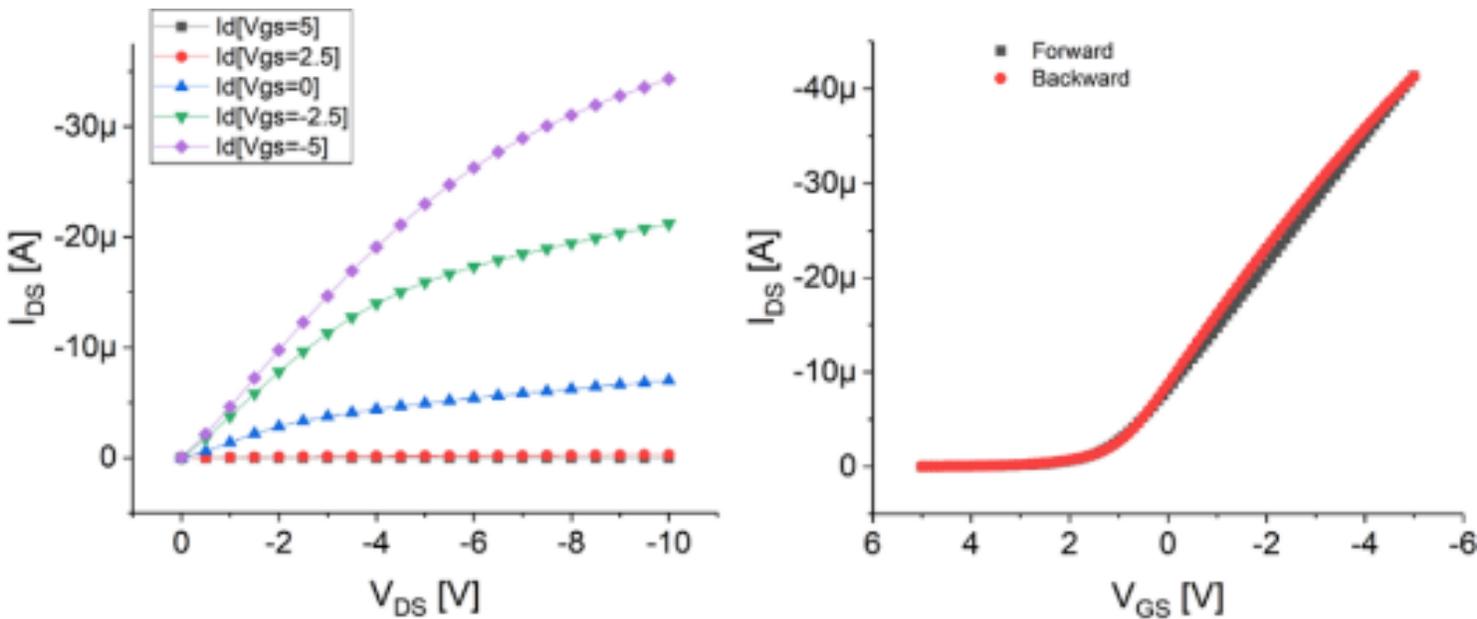
Il processo di fabbricazione è stato testato su substrati flessibili (**poliimmide (A)**) e substrati rigidi (**quarzo (B)**).



Il progetto ORGANOI³D

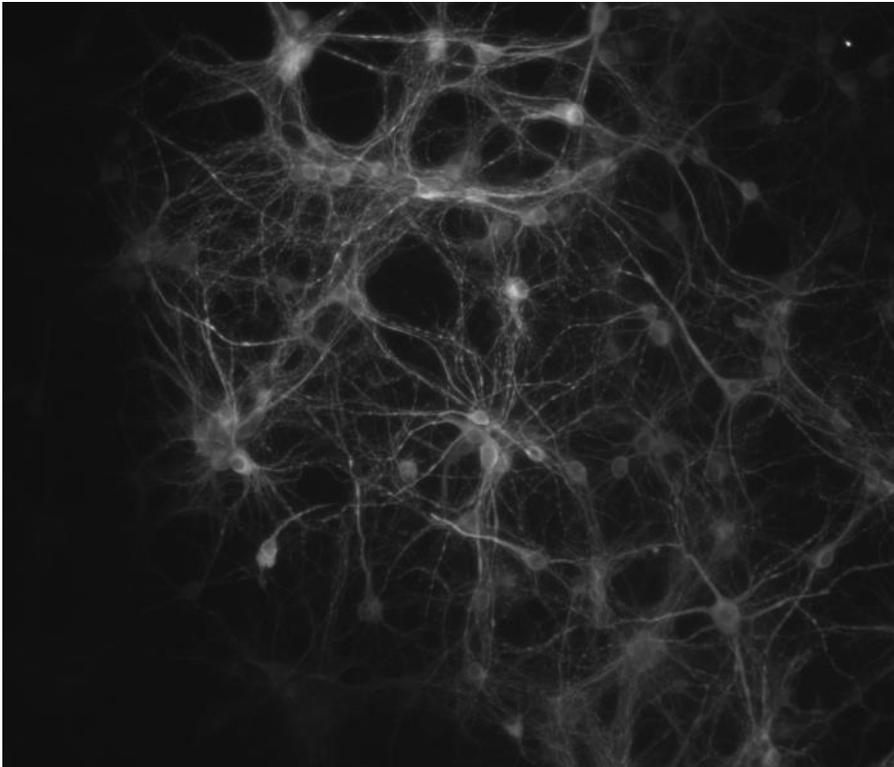
Mobilità [$10^{-3} \text{ cm}^2/\text{Vs}$]	Tensione di soglia [V]	I_{ON}/I_{OFF}
$1,1 \pm 0,1$	$1,40 \pm 0,3$	461 ± 57

I transistor realizzati hanno mostrato ottime caratteristiche dal punto di vista della riproducibilità del processo e della mobilità.

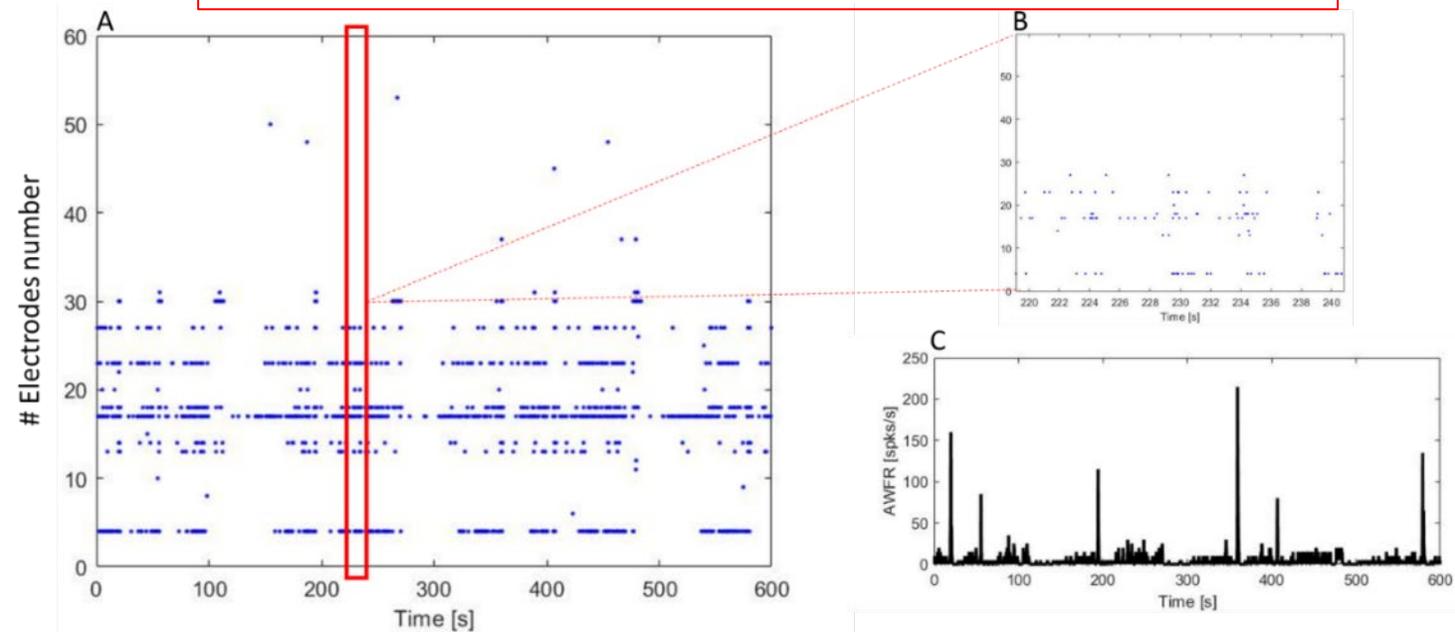


Il progetto ORGANOI³D

La **biocompatibilità** dei dispositivi è stata preliminarmente testata con **colture primarie neuronali**.



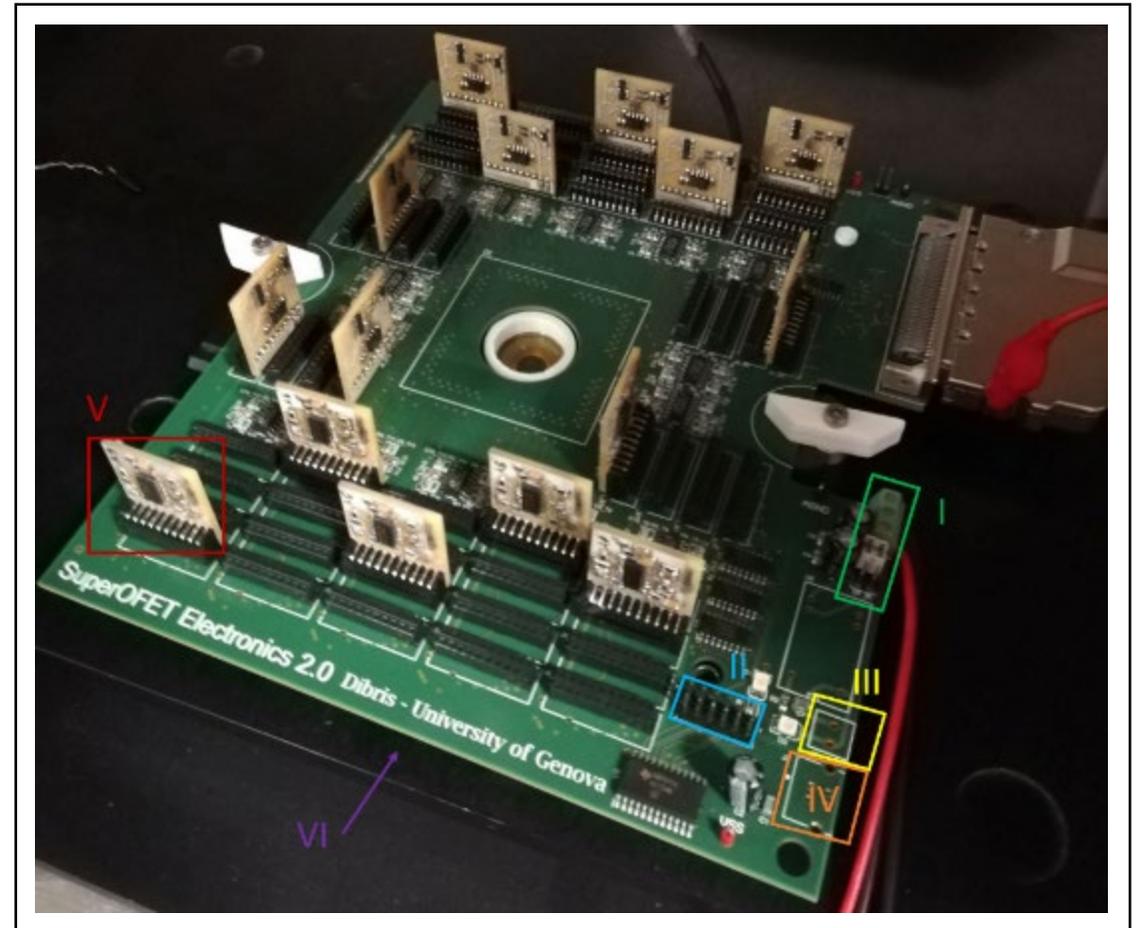
Il processi di coltura dei neurosferoidi è stato messo a punto dal laboratorio di Neuroingegneria e Neurotecnologie del DIBRIS. La caratterizzazione funzionale effettuata con MEA classici ha confermato il **corretto sviluppo degli sferoidi**.



Il progetto ORGANOI³D

Elettronica di lettura modulare per l'amplificazione di segnali sia elettrici che metabolici

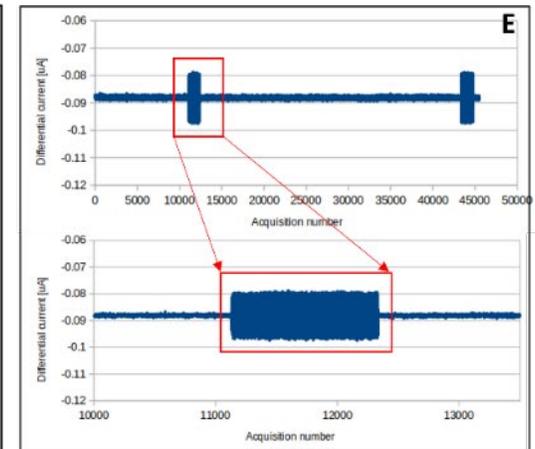
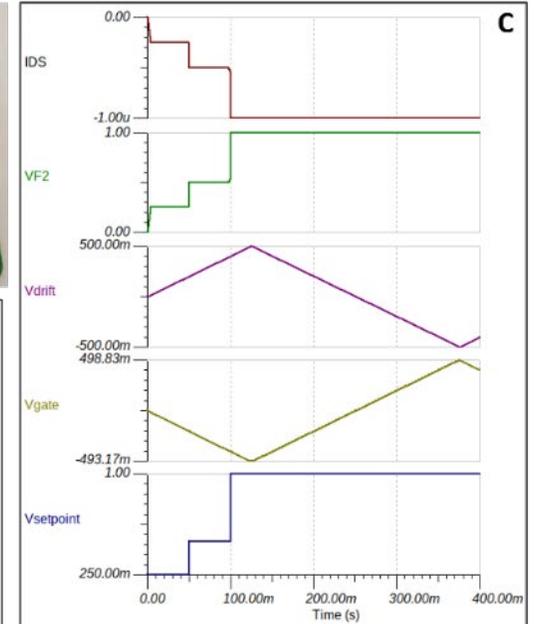
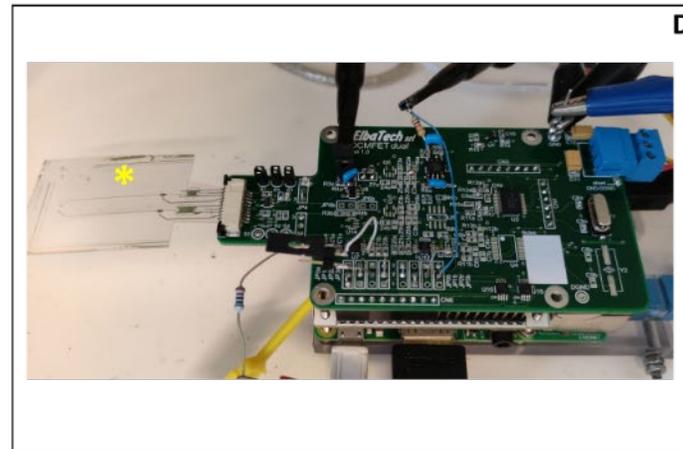
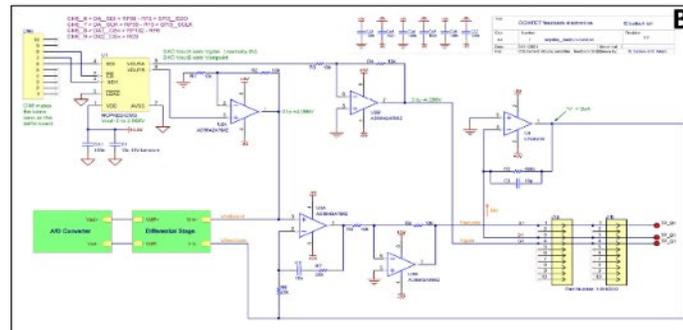
Conversione I/V sulla scheda principale e 56 PCB con circuiti di polarizzazione indipendenti per ogni OCMFET.



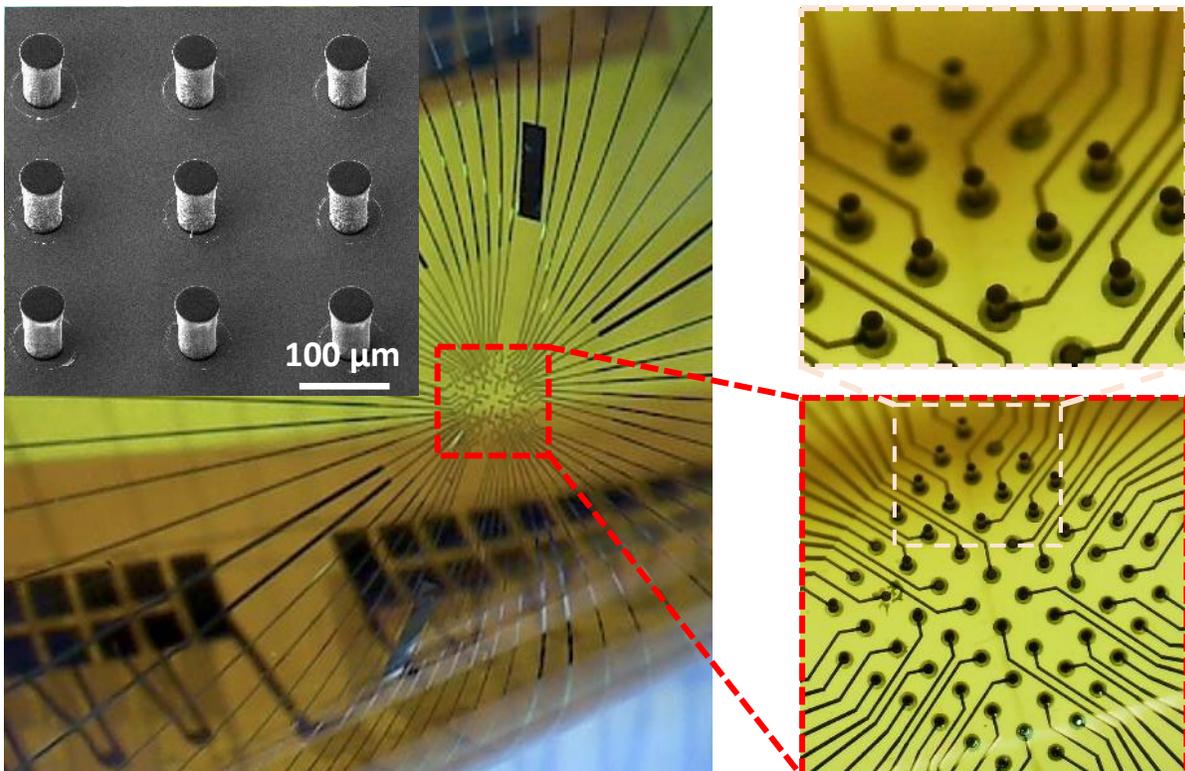
Il progetto ORGANOI³D

Il **nuovo prototipo** di circuito di lettura sviluppato in collaborazione con Elbatech s.r.l. è stato specificamente progettato per la **rimozione del bias stress**, una variazione in bassa frequenza dovuto alla natura stessa dei materiali utilizzati e che costituisce uno dei problemi principali dell'utilizzo di transistor organici.

Il prototipo consiste in una PCB a due canali ed è stato testato con strutture MOA a due canali realizzate ad hoc.



Il progetto ORGANOI³D: outlook



Avanzamenti rispetto al brevetto:

- ✓ Prime **misure simultanee di attività elettrica e metabolica**
- ✓ Processo di fabbricazione di MOA con aree sensibili 3D compatibile con substrati plastici
- ✓ **Da 16 a 56 dispositivi su uno stesso substrato**
- ✓ Nuovo prototipo di elettronica (**maggior stabilità** delle misure e maggior versatilità)

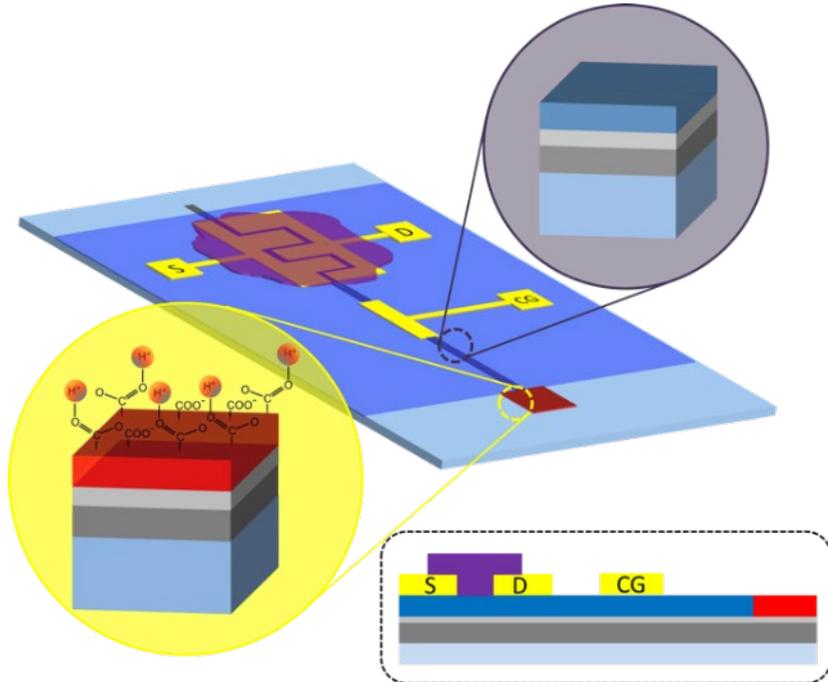
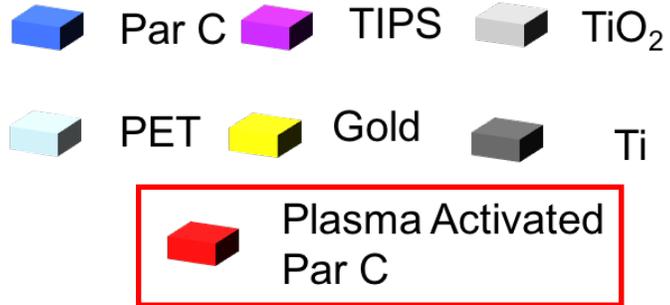
Prossimi passi:

- Test con neurosferoidi
- Realizzazione di una nuova elettronica multicanale
- Passaggio all'ultra conformabile

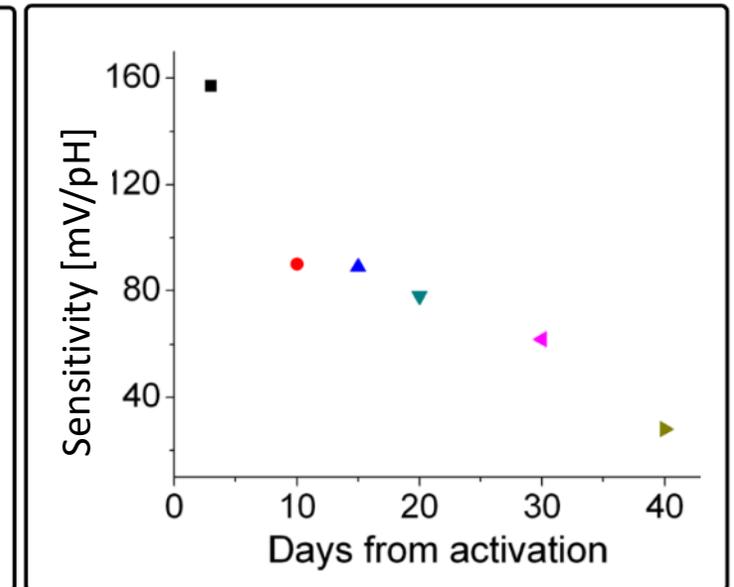
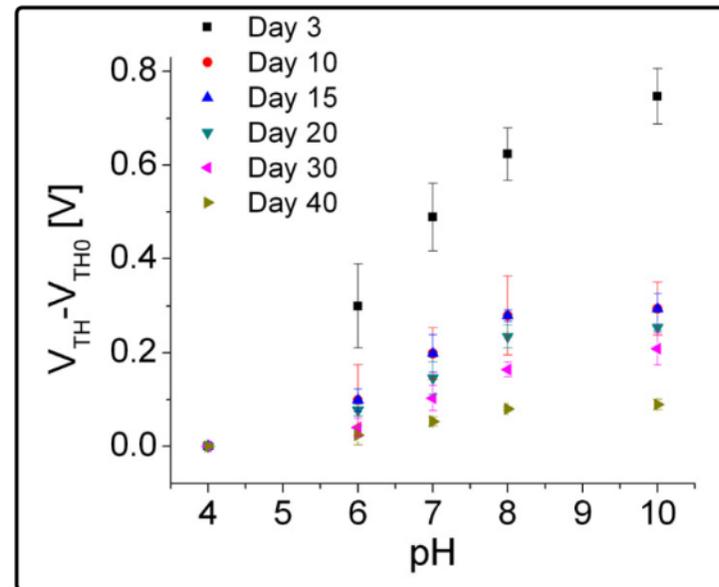


Slide di backup

MOAs for metabolic activity recordings

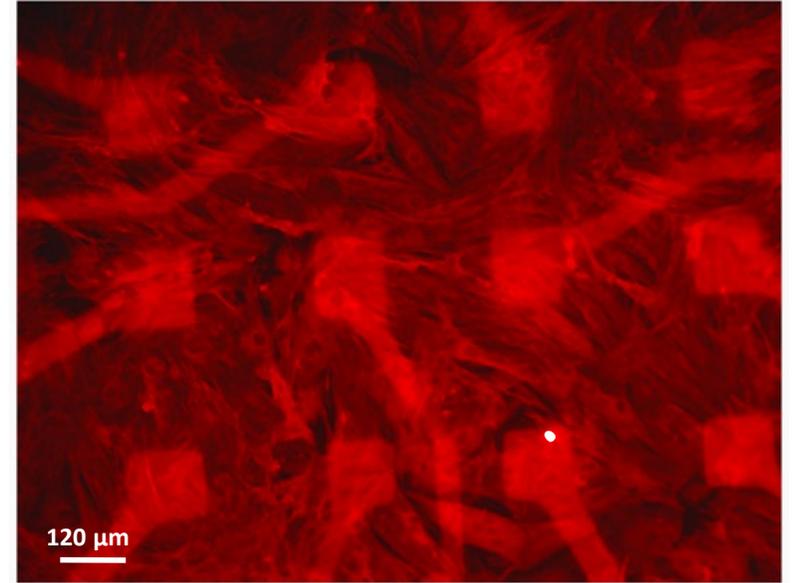


- **Intrinsic amplification** due to the double-gate structure
- **Simple sensing area functionalization:** Oxidised Par C (physical surface modification)
- **No need of an external reference electrode**

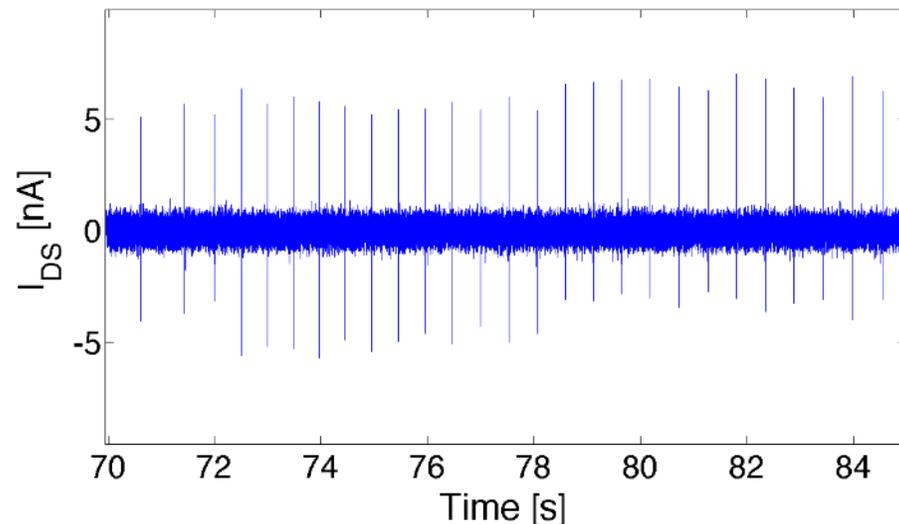


Device validation: cardiomyocytes cultures

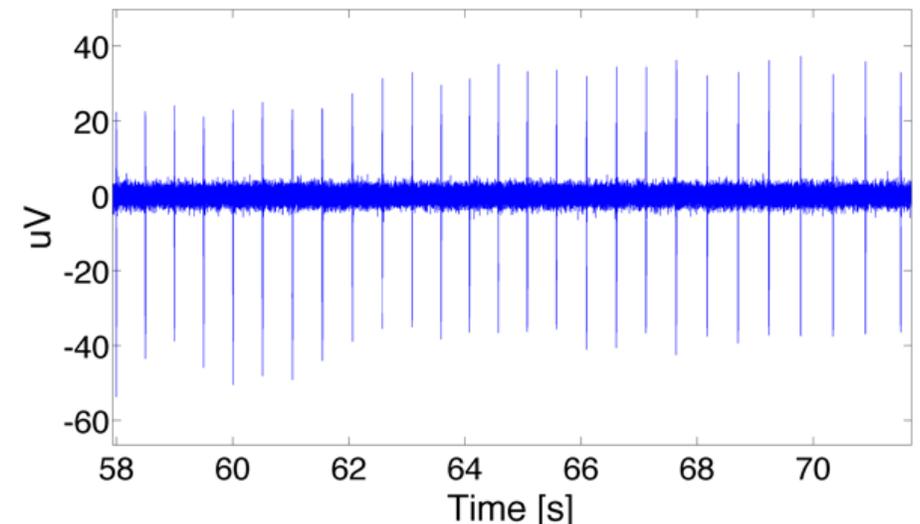
- Rat cardiomyocytes primary cultures
- Measurements performed @ 37 °C
- $V_{GS}=V_{DS}= -1$ V
- All the experiments have been carried out inside a Faraday cage
- Activity of the same culture measured with different methods (Multi Channel Systems MEA1060 Amplifier)
- No need of a reference electrode



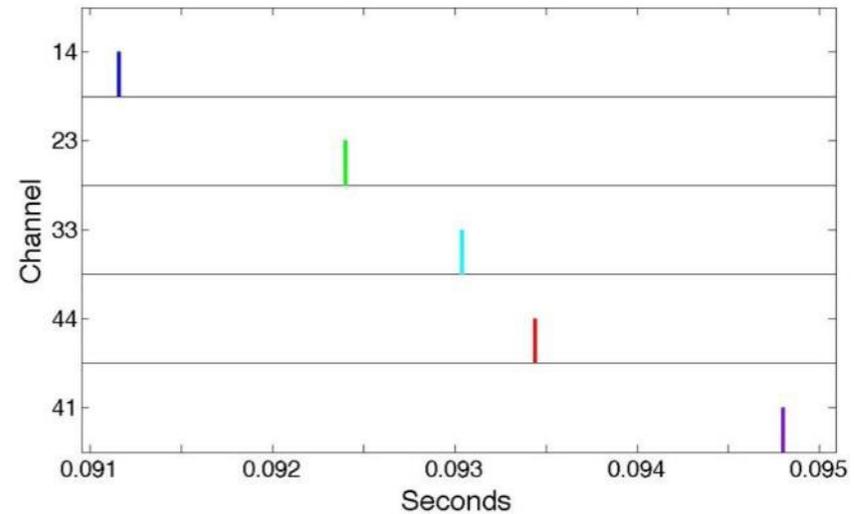
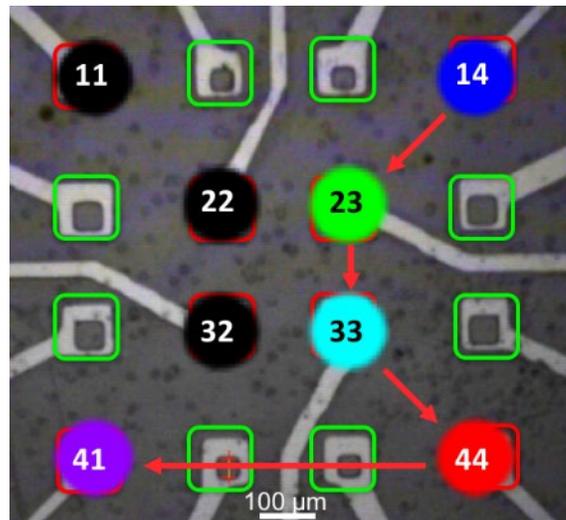
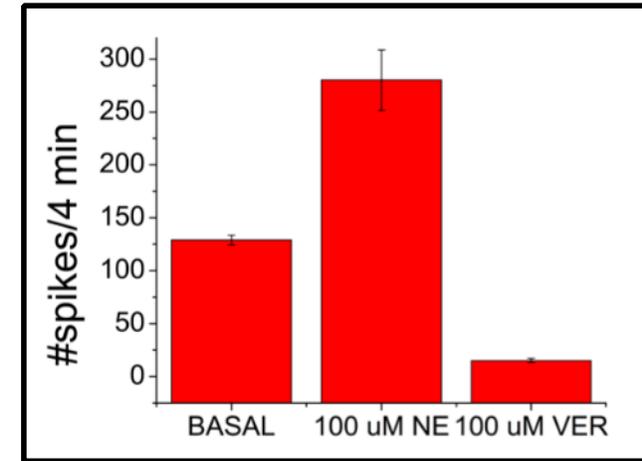
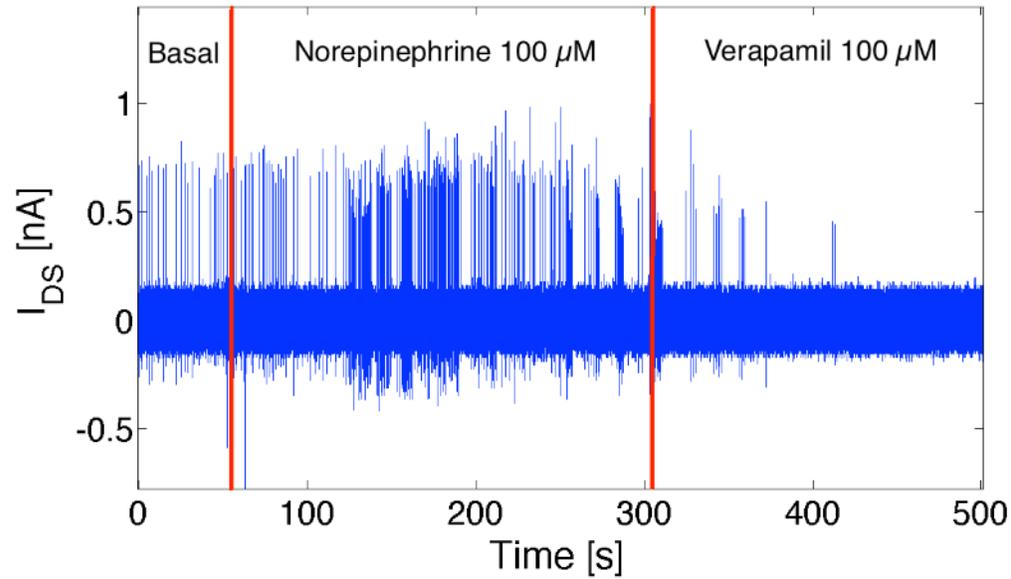
OCMFET Recording



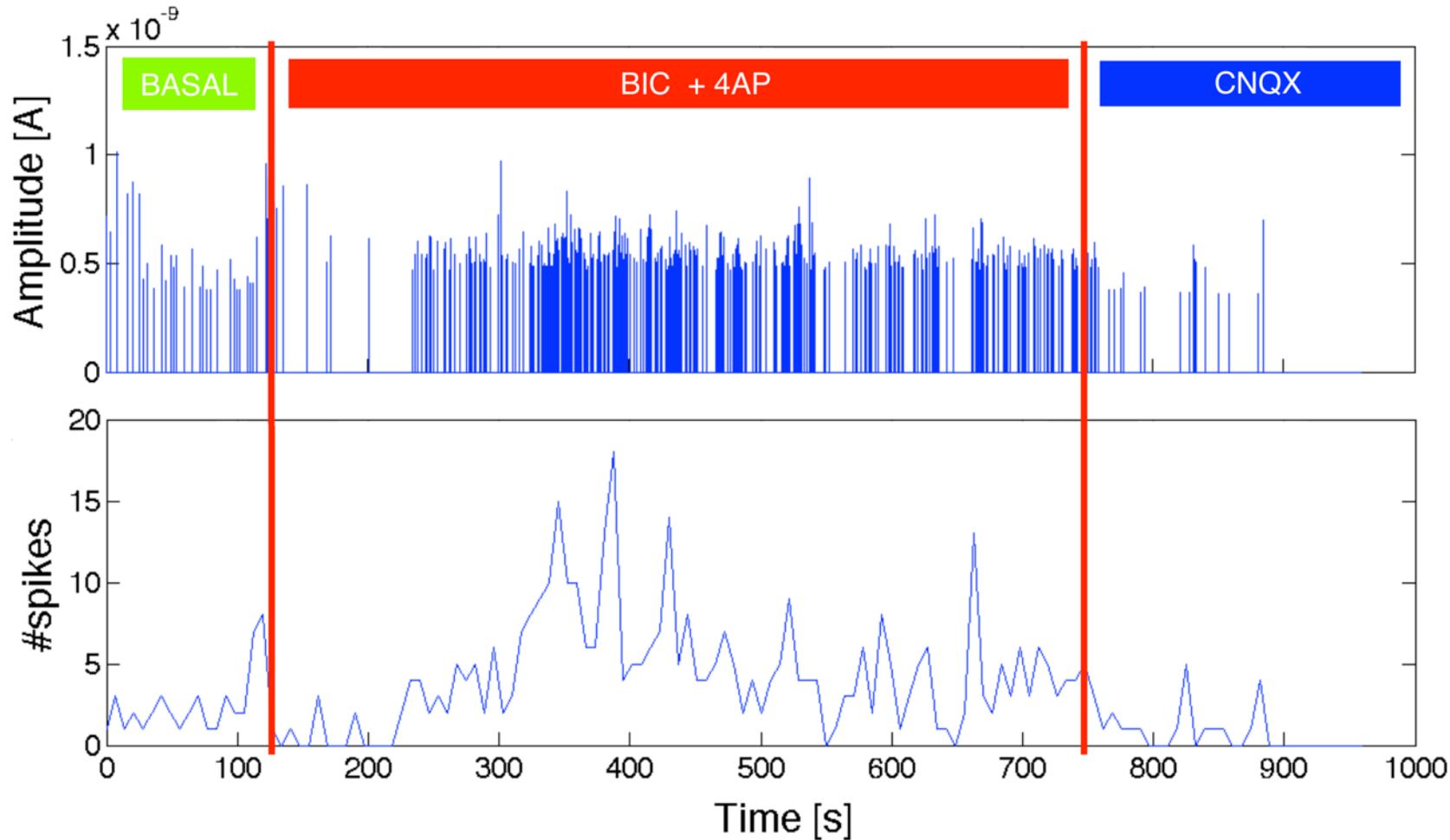
Microelectrode Recording



Device validation: cardiomyocytes cultures



Neuronal electrical activity recordings in vitro



Basal activity

Spike frequency: 0.3 Hz

4Amino Pyridine (4AP):

Reduction of the threshold of excitability.

Bicuculline (BIC):

Blockade of the inhibitory action of GABA_A receptors

Spike frequency: 0.9 Hz

CNQX:

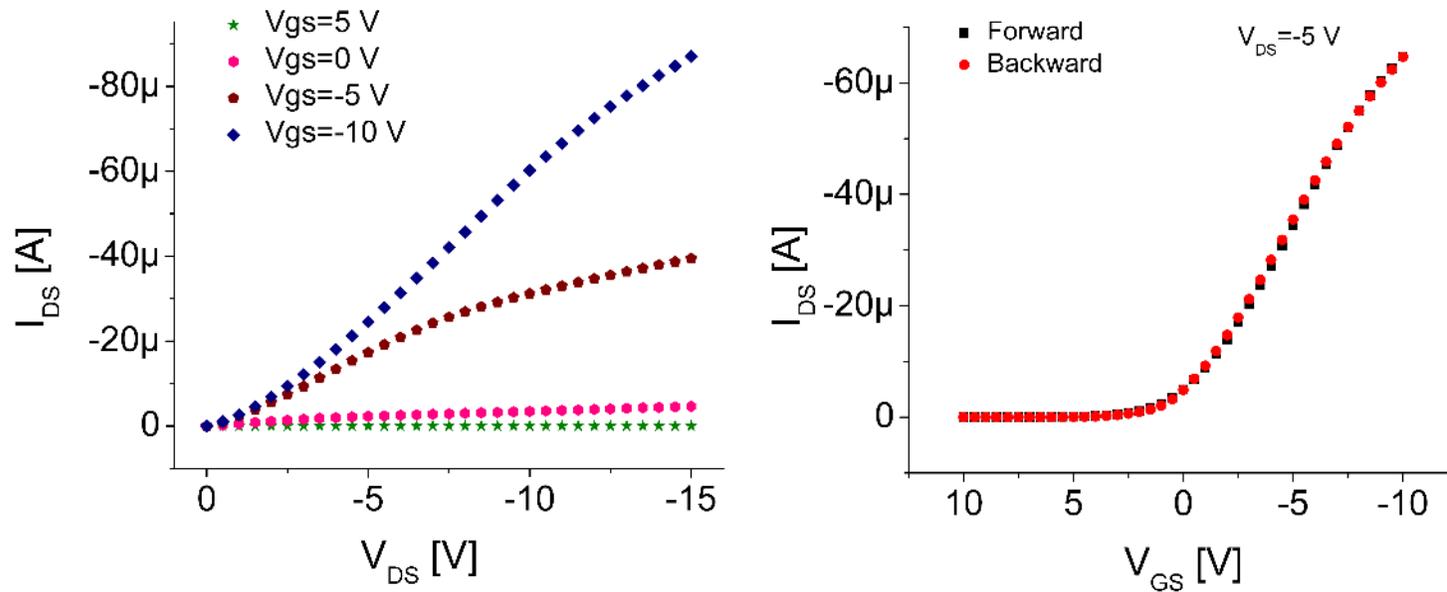
AMPA/kainate glutamate receptor antagonist

Spike frequency:



3D Micro OCMFET Array

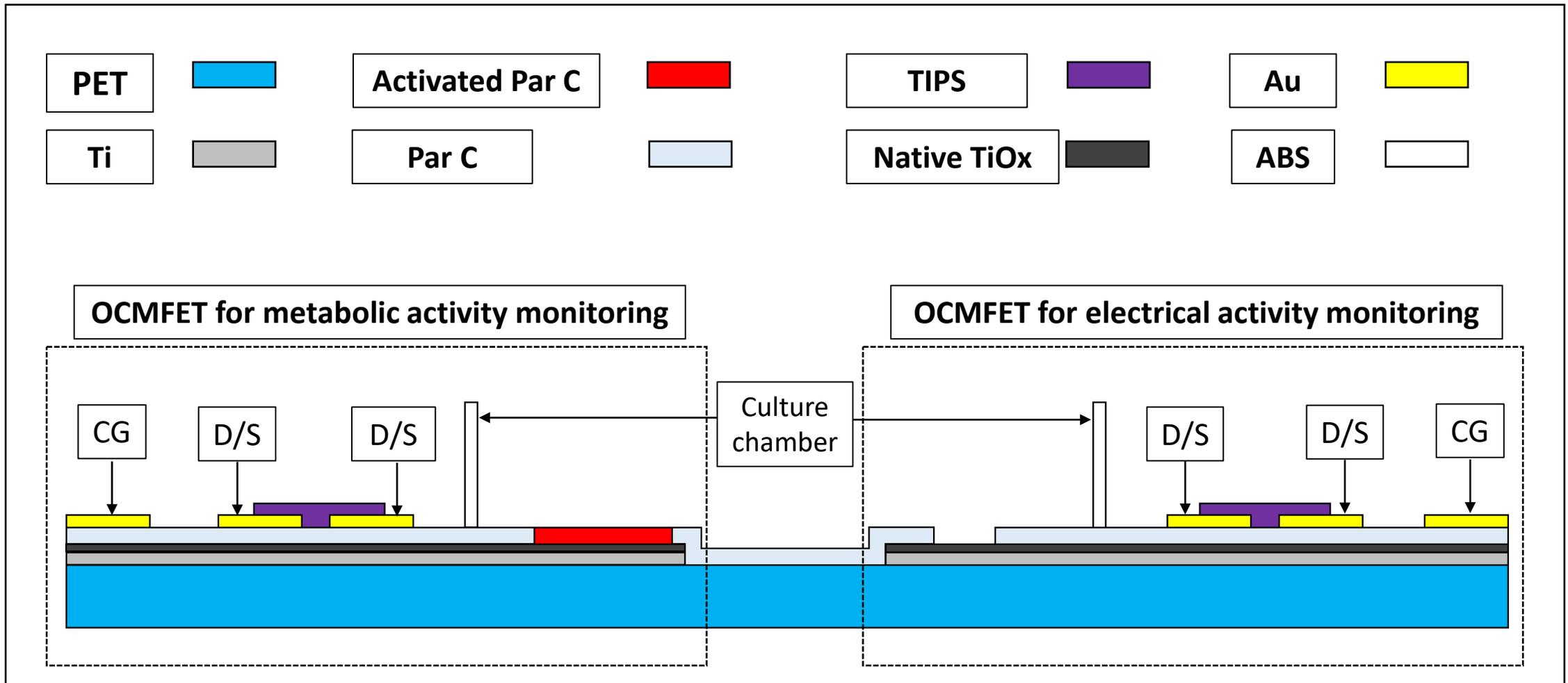
Goal: combining the potentials of OCMFET arrays for cellular interfacing and innovative fabrication techniques to obtain high performing tools with three-dimensional recording areas for brain organoids applications.



Low-voltage high-performing organic transistors



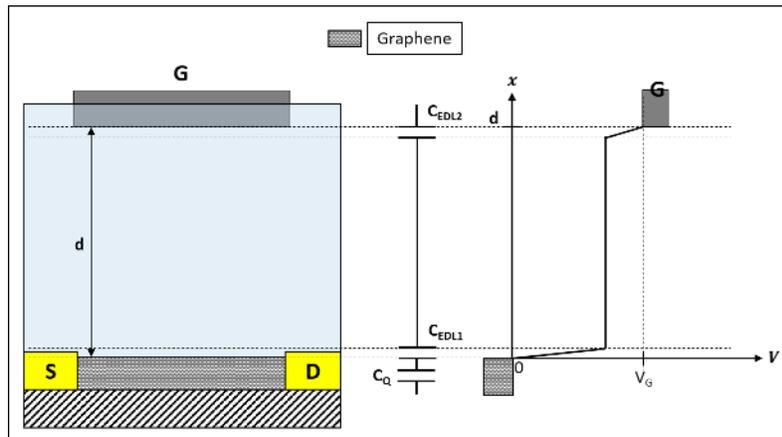
Structure of the device for simultaneous recordings



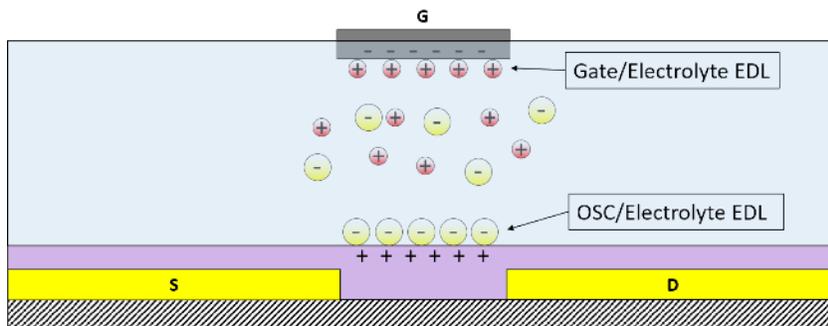
Organic transistor-based cellular interfaces

Electrolyte-gated devices

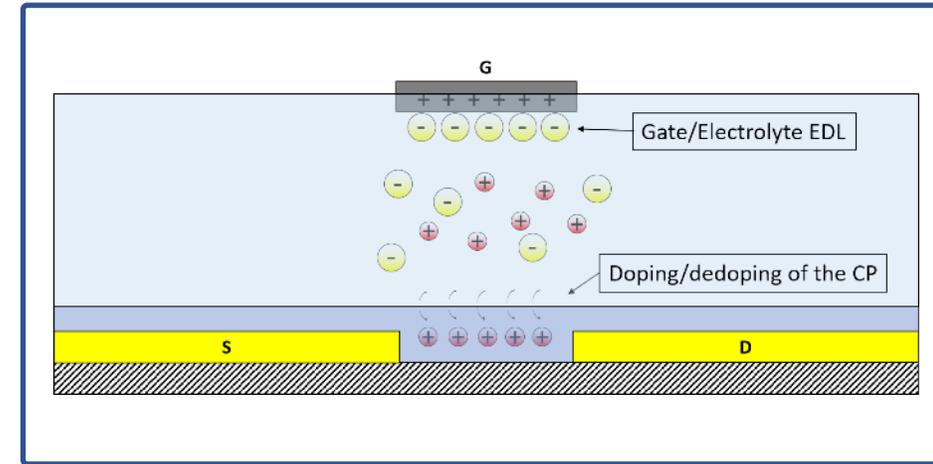
Solution-gated Graphene transistors



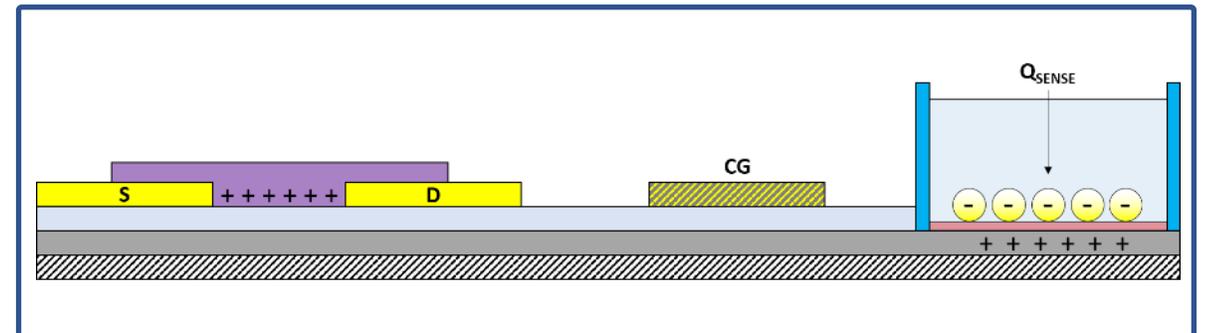
Electrolyte-gated OFET



Organic Electrochemical transistor



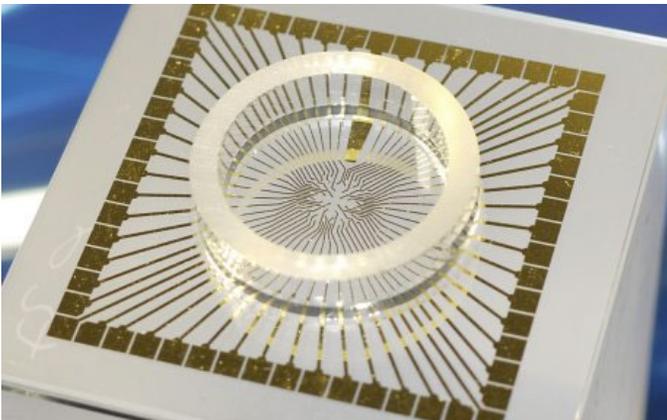
Charge sensors



Spanu, A., Martines L., Bonfiglio A. "Interfacing cells with organic transistors: a review of in vitro and in vivo applications." *Lab on a Chip* 21.5 (2021): 795-820.

L'impatto dell'elettronica organica

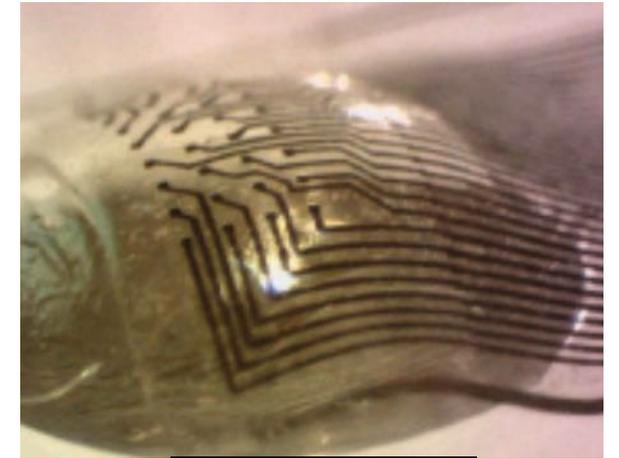
Micro electrode arrays



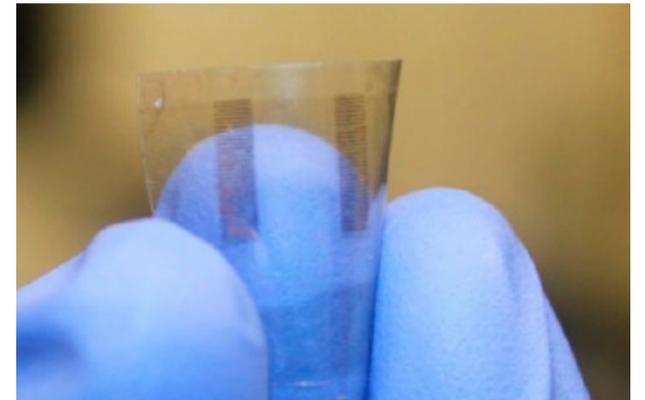
Organic electronics



Conformability

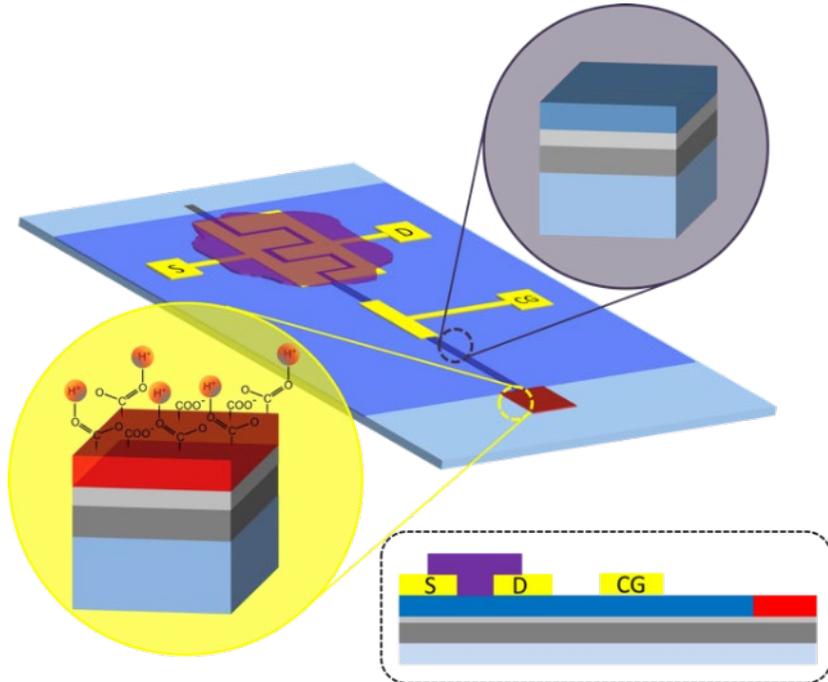
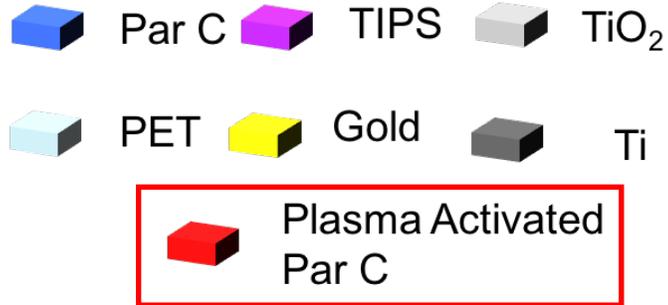


Stretchability

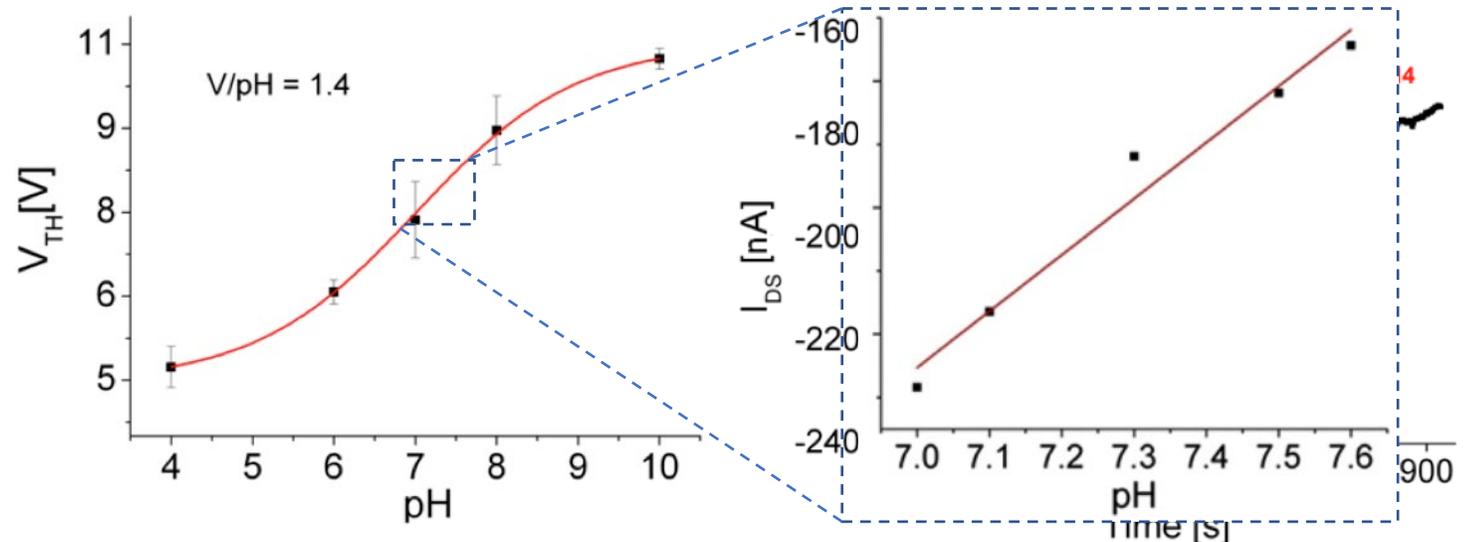


Optical transparency

L'OCMFET per applicazioni cellulari: il Micro OCMFET Array

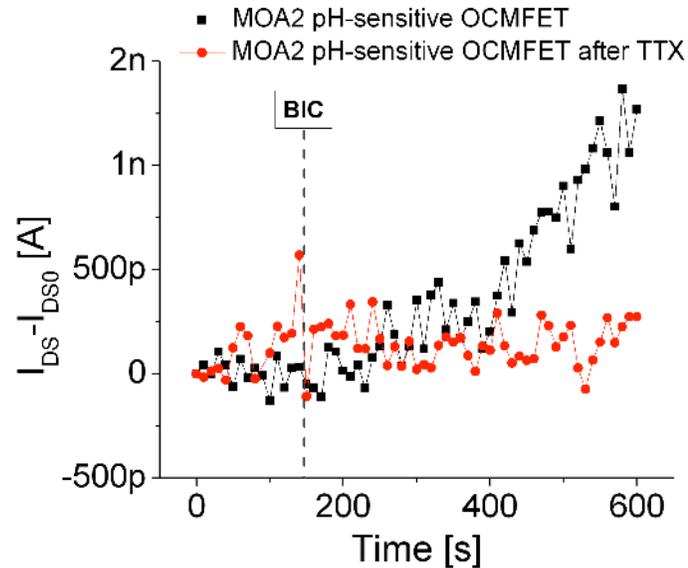


- **Intrinsic amplification** due to the double-gate structure
- **Simple sensing area functionalization:** Oxidised Par C (physical surface modification)
- **No need of an external reference electrode**

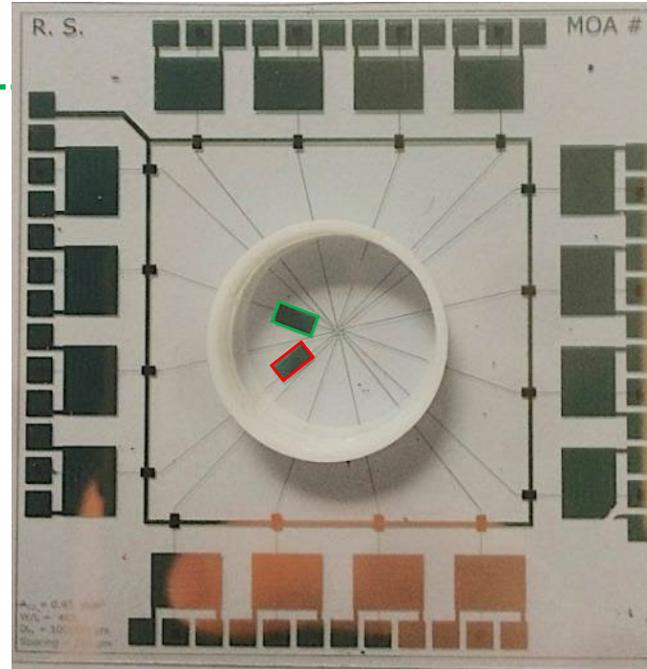
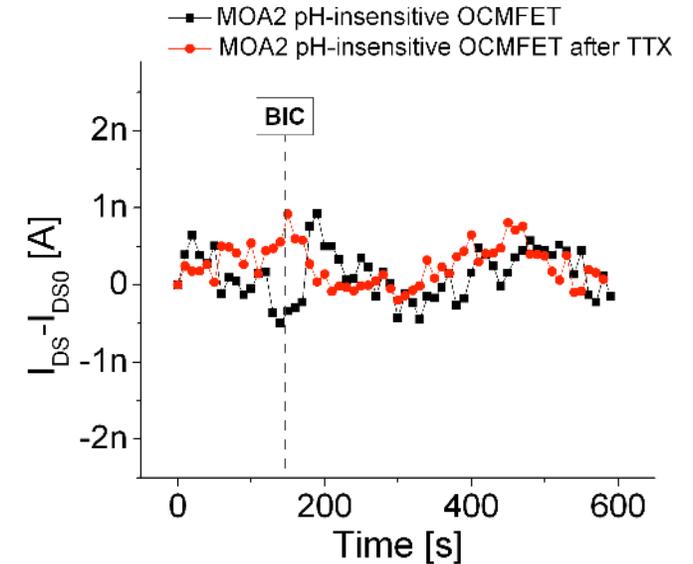


L'OCMFET per applicazioni cellulari: il Micro OCMFET Array

pH-sensitive channel



pH-insensitive channel



- In the **pH sensitive device**, after the addition of 25 μM of BIC the **current suddenly changes** (local acidification).

- In the **pH insensitive device**, **no difference in observed** between the basal and the BIC-mediated Activity

- The **addition of 10 μM of TTX** causes a quick cells death, and the active channel started behaving like the inactive one.

L'OCMFET per applicazioni cellulari: il Micro OCMFET Array

