

Descrizione del Progetto “Matrici di nano-trasduttori per interfacce bioelettroniche con controllo a circuito chiuso (NANOBEL)”

Descrizione degli obiettivi del progetto di ricerca (<4000)

Nel nostro progetto NANOBEL proponiamo di sfruttare gli sviluppi significativi avvenuti nell’ultimo decennio nella tecnologia delle interfacce elettroniche con il sistema nervoso. L’introduzione di materiali innovativi e multifunzionali, combinato con la possibilità di strutturarli su scala nanometrica, hanno enormemente migliorato le prestazioni di tali interfacce. Da un lato, la scoperta di nano-materiali elettricamente attivi ma allo stesso tempo biocompatibili, rende gli elettrodi in contatto con il tessuto nervoso meno invasivi e adatti per registrazioni e stimolazioni a lungo termine. Dall’altro lato, gli sviluppi nella microelettronica permettono di generare grandi matrici di sensori elettrofisiologici in parallelo, e di trasmettere l’enorme mole di dati acquisiti in tempo reale dal sistema nervoso ad un sistema centrale per l’analisi dei dati, con eventuale integrazione in sistemi di feedback per stimolare il sistema nervoso con approccio terapeutico (trattamento del dolore e di stati infiammatori). Un esempio di tale tecnologia è rappresentato nell’immagine 1, che mostra un sensore elastico per registrazioni da nervi periferici piccoli, realizzato dal nostro gruppo di ricerca.[1]

La conseguenza di questi due progressi significativi è un nuovo approccio terapeutico chiamata Bioelectronic Medicine[2] che combina medicina molecolare, ingegneria, neuroscienze e scienze computazionali, per sviluppare nuovi metodi di diagnosi e trattamento di patologie infiammatorie e disturbi neuromotori mediante interfacce tessuto-apparato ed elaborate analisi dei segnali bioelettrici. L’approccio si basa su evidenze teoriche e sperimentali del fatto che i segnali nervosi regolano processi fisiologici e patologici, in particolare la risposta infiammatoria. La rilevanza di questo innovativo approccio viene sottolineata da recenti investimenti nella formazione di nuove aziende attive nell’ambito della Bioelectronic Medicine come “Galvani Bioelectronics” di Google e “Neuralink” di Elon Musk. Anche sul nostro territorio regionale questo aumento di interesse in tecnologie bioelettroniche ha portato la formazione di nuove start-up e SME come “Elements SRL” di Cesena o Organic Bioelectronics SRL di Ferrara.

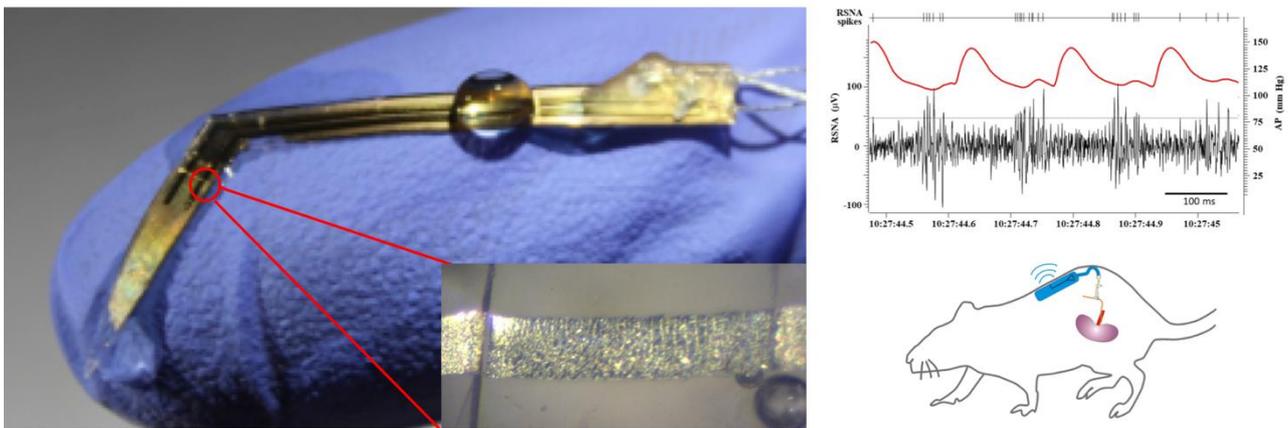


Figura 1 – Immagine di un dispositivo nano-bioelettronico per registrazioni del sistema nervoso periferico da nervi piccoli con elettrodi elastici. Dati esemplari e schema del sistema impiantato con trasmissione dati wireless (De Cataldo et al. Sci. Rep. 2019).

In questo progetto, uno dei punti più critici nello sviluppo di nuove terapie di Bioelectronic Medicine è l’analisi dei dati in tempo reale, e l’implementazione di modelli a feedback da integrare in questi sistemi per stimolare il campione. Grandi matrici di sensori bioelettronici producono un enorme quantità di dati, e servono metodi ottimizzati per estrarre informazioni in tempo reale da un segnale contenente rumori stocastici o informazioni non rilevanti. Successivamente, l’informazione acquisita deve essere integrata in

dispositivi avanzati di feedback, generando un segnale elettrico in grado di stimolare processi rigenerativi o antinfiammatori.

Gli obiettivi del progetto consistono quindi 1) nello sviluppo di matrici di sensori con materiali nanostrutturati su substrati flessibili con alta biocompatibilità; 2) nello sviluppo e implementazione di metodi per l'analisi di dati elettrofisiologici multicanali (fino a 64 canali in parallelo) in tempo reale, e 3) la dimostrazione in vitro e in vivo dei metodi proposti in un prototipo di dispositivo bioelettronico con stimolazione guidata a circuito chiuso.

Descrizione del carattere di originalità e innovatività della proposta progettuale (<3000)

I principali problemi che limitano l'avanzamento delle interfacce neurali in ambito medico (diagnostico e terapeutico) sono rappresentati dai materiali utilizzati, la trasduzione del segnale e la complessità dell'analisi dati. Risultano infatti necessari materiali biocompatibili, non-invasivi in utilizzi prolungati, soffici ed elettroattivi, ma è anche fondamentale la comprensione fisica dell'interfaccia cellula/elettrodo, da cui dipendono il meccanismo e l'efficacia della trasduzione del segnale.

Nel progetto proponiamo una soluzione innovativa ed originale a questi problemi, introducendo i polimeri semiconduttori organici come interfacce neurali. Attraverso la nanofabbricazione, questi materiali combinano biocompatibilità, alta conduttività ionica ed elettronica e soffici proprietà meccaniche. Le trasduzioni dei segnali possono essere amplificate in situ implementando meccanismi di controllo della conducibilità elettrica attraverso flussi di cariche ioniche (transistor elettrochimici organici). Questi materiali permettono di ottenere interfacce morbide ed allungabili, anche in 3D, fornendo un banco di prova innovativo per investigare le interazioni biofisiche all'interfaccia di trasduzione. Le informazioni ottenute da tali esperimenti porteranno a siti di trasduzione capaci di stimolazioni più efficienti e registranti con migliori rapporti segnale/rumore.

Per affrontare invece la difficoltà dell'analisi di ingenti moli di dati, il progetto esplora i recenti sviluppi del "machine learning" nella gestione ed analisi di grandi quantità di dati. Sistemi basati su reti neurali artificiali, come funzioni radiali di base o l'apprendimento per rinforzo, sono recentemente emersi come metodi a bassa complessità computazionale per elaborare in tempo reale vaste quantità di dati. La loro forza è dimostrata nell'analisi immagini, sistemi di guida automatizzati e in molti altri esempi. Nel progetto ci proponiamo di utilizzare questi metodi su registrazioni neuronali multicanale, per estrarre parametri descrittivi della intercorrelazione dei dati e delle attività e connettività delle reti neurali. Questi elementi possono poi essere utilizzati in controlli di feedback per stimolazioni sui tessuti neurali o per attuatori agenti su organismi biologici. L'approccio proposto apre la strada verso un controllo preciso dei sistemi biologici in tempo reale e mira a risolvere i problemi legati all'incertezza, aleatorietà e complessità non-lineare presenti negli organismi complessi.

Per dimostrare l'avanzamento tecnologico, il progetto NABEL prevede esperimenti in-vitro ed in-vivo in collaborazione con gruppi di ricerca biomedica. Queste prove da un lato usano modelli cellulari stabiliti per esami standard, dall'altro si focalizzano su importanti interrogativi in ambito biomedicale come l'impatto dei segnali dei nervi periferici nei processi infiammatori.

Descrizione della coerenza con i temi di rilievo trasversale per il PNR 2021 – 2027 (massimo 3000 caratteri)

Una delle sfide prioritarie identificate nelle prime pagine del PNR-salute, allegato esteso punta su "sviluppare soluzioni di medicina di precisione e personalizzata". Con questo riferimento si intendono interventi terapeutici, che si basano su dati diagnostici precisi, raccolti dai pazienti tramite tecnologie avanzate ed elaborati con metodi "big data" per guidare con più precisione le misure terapeutiche, riducendone l'invasività e migliorandone l'effetto curativo. Tra le malattie aventi maggior impatto nella nostra società, il PNR-salute identificate nella articolazione 4 "Neuroscienze e salute mentale" le malattie neurodegenerative e i disturbi neurologici. Nonostante queste malattie abbiano un'incidenza rilevante "del 7,5% all'anno", esistono pochi metodi terapeutici, finora limitati solo alla cura della sintomatologia delle malattie. Per affrontare questa sfida il PNR-salute prevede azioni che "riguardano soprattutto l'aumento delle conoscenze neurobiologiche, i legami tra periferia-SNC, l'impatto del sistema immunitario e del microbiota sulla funzionalità cerebrale". Il progetto NANOBEL è coerente con queste richieste del PNR-Salute, proponendo una tecnologia per le interfacce neurologiche. La combinazione di matrici di sensori per la raccolta di dati in

tempo reale con sistemi di analisi e feedback mirano ad un'azione altamente personalizzata e locale del dispositivo. Personalizzazione e precisione sono punti chiave delle terapie della "Bioelectronic Medicine". Il dispositivo proposto si basa su metodologie già descritte in letteratura dai gruppi di ricerca coinvolti in NANOBEL : partendo da un "technology readiness level" elevato, sono previsti, a fine progetto, studi su modelli in-vivo più realistici, volti a far progredire la ricerca verso studi clinici. Un tale avanzamento è sottolineato nel PNR-salute nella sottocategoria 1.4 – Tecnologie per la salute- e viene declinato con più precisione nell'articolo 7 ("Dispositivi medicali ...") e 11 ("Sistemi bio-ibridi .."). Al contempo, NANOBEL mira ad una tecnologia molto versatile e compatibile con diverse richieste cliniche, potendo essere applicata a diversi tessuti o malattie nervose (esempi nervi periferici – infiammazione, corteccia cerebrale – brain machine interfaces, Spina dorsale – medicina rigenerativa).

Il progetto NANOBEL è anche inserito nelle linee di ricerca proposte dal PNR riguardo l'ambito "Digital, industry, aerospace" , in particolare in riferimento al capitolo "4.3 Intelligenza Artificiale" dell'allegato esteso. L'articolo 3 – Intelligenza Artificiale per la salute pone l'obiettivo di "Sviluppare specifici algoritmi, prototipi, sistemi (sia cloud che edge) che possano essere generalizzabili e multi-task (...)". Nel progetto NANOBEL è prevista l'implementazione di algoritmi per l'analisi di dati neurologici, rappresentanti nuove sfide per algoritmi AI per la non-linearità e convoluzione con processi stocastici dei dati da analizzare.

Illustrazione dei profili di interdisciplinarietà della ricerca e complementarità di competenze tra PI e CO-PI (massimo 3.000 caratteri)

Il progetto NANOBEL è strutturato in 3 distinti work-packages (WP) che sfruttano le competenze complementari interdisciplinari dei PI e CO-PI partecipanti al progetto:

Il WP1 riguarda la fabbricazione di matrici di nano-trasduttori, le cui proprietà verranno ottimizzate in termini di compatibilità con le interfacce nervose e di rapporto segnale/rumore, tramite tecniche di nanofabbricazione e scienza dei materiali. Il PI del progetto (Tobias Cramer – SSD FIS/03 FISICA DELLA MATERIA) ha un'esperienza pluriennale nella fabbricazione e nell'utilizzo in-vitro e in-vivo di tali dispositivi, come documentato nella letteratura pubblicata negli ultimi anni e nei progetti finanziati. Il lavoro sperimentale si basa interamente su laboratori presenti nel dipartimento del Difa, alla cui innovazione ed ampliamento il PI ha notevolmente contribuito negli ultimi anni.

Il WP2 riguarda principalmente l'analisi dei dati registrati dalle matrici sensorizzate e l'implementazione di un sistema di feedback per controllare le stimolazioni del dispositivo. Il lavoro richiede competenze altamente specializzate nell'ambito del machine learning e big data, come presentato dal Co-PI Daniel Remondini (SSD FIS/07 FISICA APPLICATA). Con il suo gruppo Daniel Remondini ha pubblicato diversi lavori in riviste di alto impatto e contribuito in progetti europei, studiando sistemi dinamici complessi applicati alla biologia, come reti neurali o sistemi immunitari. Nei suoi studi ha dimostrato un approccio originale ed innovativo utilizzando metodi di Machine Learning, Deep Learning e Intelligenza Artificiale.

Nel WP3 si applica la tecnologia sviluppata nei WP2 e WP1 ad esperimenti con cellule e tessuti biologici. Il lavoro si basa sulle competenze del gruppo di Roberto Amici (SSD BIO/09 FISIOLOGIA). Il gruppo conduce diversi esperimenti con piccoli animali, investigando gli effetti neurologici attraverso un'interfaccia per lettura e stimolazione di segnali neurali, aprendo nuove opportunità alla ricerca *in-vivo*. Esempi principali sono i processi infiammatori e la loro correlazione al sistema nervoso periferico e l'ibernazione artificiale. Il PI ha già avviato una collaborazione con il gruppo di Roberto Amici, con risultati recentemente pubblicati. Per il progetto NANOBEL questa collaborazione verrà potenziata, lavorando non solo su dispositivi di lettura ma anche di stimolazione neurale.

Linea di intervento A: Illustrazione dell'impatto della ricerca (massimo 3.000 caratteri);

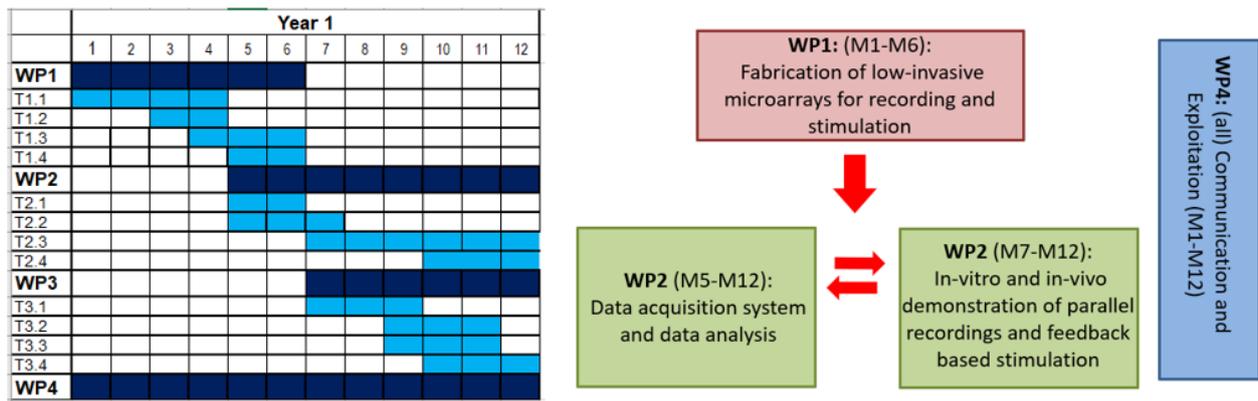
Impatto scientifico: Il progetto NANOBEL è in linea con gli approcci che attualmente puntano ad aumentare la tecnologia delle interfacce neuronali. Aspetti fondamentali riguardano la scienza dei materiali necessaria ad ottenere recording precisi e riproducibili, abilità di stimolazione e dispositivi poco invasivi e affidabili nel lungo termine. Queste tematiche sono affrontate nel progetto mediante nuovi materiali semiconduttori organici nanostrutturati. Questi materiali hanno già dimostrato la loro utilità in applicazioni bioelettroniche, ma sono richieste nuove tecniche per processarli in strutture tridimensionali e in dispositivi elastici che seguano la meccanica dei tessuti. Progressi in questo ambito estenderebbero significativamente lo stato dell'arte delle interfacce neuronali e sarebbero di interesse per un'ampia parte della comunità scientifica. Inoltre, la ricerca proposta otterrebbe un impatto significativo in quanto riguarda l'operatività in **feedback-control** degli impianti bioelettronici. La collaborazione con esperti di algoritmi di machine learning sono necessari per ottenere sviluppi in questo campo. Tali algoritmi permetterebbero di ridurre in tempo reale la complessità dei dati raccolti e di ottenere predittori affidabili utilizzabili come **controller inputs**. Questa proposta sfrutta il recente progresso nel campo del machine learning, ed è quindi in una posizione privilegiata per mostrarne la realizzabilità.

Impatto per il DIFA: Il DIFA ha investito negli ultimi anni nel laboratorio **OPH**, puntando all'implementazione di nuove tecnologie sensoristiche. Questo progetto ben vi si integra e coinvolge diversi gruppi del dipartimento. Sono coinvolte nel progetto sia ricerche sperimentali associate a fisica e biofisica dei materiali, che ricerche teoriche di fisica applicata come data analysis e data science. Entrambe queste linee di ricerca hanno dimostrato indipendentemente grandi successi al DIFA negli ultimi anni (pubblicazioni, progetti). Questo prospetto di ricerca cooperativa può gettare le fondamenta per un vantaggio strategico nello sviluppo di nuove tecnologie di sensori altamente parallelizzati necessari nel settore biomedico. Il possesso di competenze riguardanti queste tecnologie farebbero il DIFA un accattivante collaboratore per futuri progetti nazionali e internazionali, coinvolgendo molteplici gruppi attivi nel dipartimento.

Impatto per UNIBO: Molti gruppi di ricerca Unibo impegnati nell'ambito biomedico stanno affrontando questioni legate a tessuti neuronali come il cervello, la colonna vertebrale o il sistema nervoso periferico. Tuttavia sino ad ora non sono state sfruttate tecnologie di interfaccia bioelettronica ad alto parallelismo nonostante gli recenti progressi. Il progetto NANOBEL stimola la collaborazione interdipartimentale e promuove la diffusione di questa tecnologia in rapida evoluzione al livello UNIBO.

j) Illustrazione dell'implementazione della ricerca (attività, work plan, ecc.), con particolare riferimento alla fattibilità e sostenibilità in relazione al finanziamento erogato (massimo 6.000 caratteri).

Il Progetto è strutturato in tre distinti WPs. Qui di seguito viene mostrata la struttura del progetto e la sua evoluzione nell'arco di un anno tramite diagrammi Gantt e Pert. Un Post-doc, completamente finanziato dai fondi del progetto, sarà a capo delle attività. Il PI del progetto e due co-PI si occuperanno della supervisione. Ulteriore supporto sarà fornito nel WP1 da un Post-doc, un dottorando e un tecnico di laboratorio del DIFA con una solida esperienza in microfabbricazione. Le attività del WP1 saranno svolte nelle strutture di micro- e nanofabbricazione del DIFA e la caratterizzazione dell'array si terrà nel laboratorio OPH. Le risorse computazionali per il WP2 sono rese disponibili dalle OPH facilities. La conduzione di esperimenti nell'ambito del WP3 richiede supporto da parte di ricercatori con background in sperimentazione biomedica. Isabella Zironi (tecnico di laboratorio DIFA-APP) fornirà supporto per esperimenti in-vitro, mentre Matteo Cerri e Davide Martelli, membri del gruppo di Roberto Amici, si occuperanno degli esperimenti in-vivo. Il supporto finanziario per materiali di consumo, cellule ed esperimenti su animali sarà fornito dai fondi RFO e integrato con fondi di Progetto EU (LIONHEARTED, PI Tobias Cramer).



WP1: Fabbricazione di microarray a bassa invasività per recording e stimolazione (M1-M6)

Task 1.1: Processo di fotolitografia: Le strutture micrometriche (risoluzione di 1 μm) dei siti di trasduzione e le linee di connessione vengono preparate mediante direct writing photolithography. Per l'ottenimento di un'elevata bendability viene utilizzato un substrato di PI, PEN o Parilene con spessore $< 80 \mu\text{m}$.

Task 1.2: Coating a bassa impedenza con semiconduttore nanostrutturato: il sensore e i siti di attuazione vengono funzionalizzati al fine di minimizzare l'impedenza di trasduzione ionica/elettronica e di ottenere bassa attività elettrochimica e stabilità a lungo termine.

Task 1.3: Interfacce 3D: per implementare sul sensore strutture con alto aspect ratio si utilizza litografia diretta con patterning in scala di grigi. Esse possono agire come elettrodi penetranti, migliorando la trasduzione su terminazioni nervose periferiche.

Task 1.4: Ottimizzazione dei connettori: Viene implementato un connettore a ingombro ridotto con 32 canali su una larghezza $< 1.5 \text{ cm}$ e ne viene testata l'affidabilità.

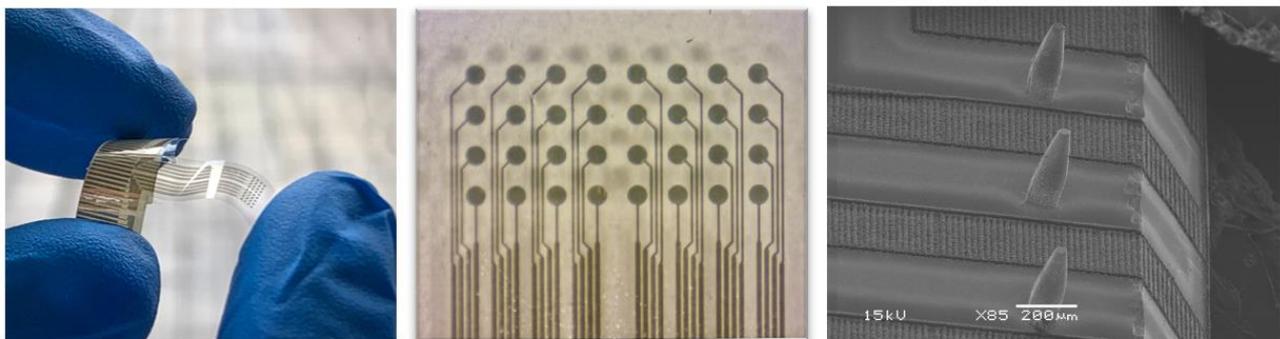


Figure 2: Sensor array fabrication from DIFA demonstrating feasibility of the presented approach: (a) Flexible, biocompatible array on plastic substrate (b) detail of recording array with 32 low-impedance electrodes (c) 3D pillars prepared by grayscale photolithography. (unpublished data)

WP2: Sistema di acquisizione dei dati e analisi dati (M5-M12)

Task 2.1: Test del sistema multicanale: Viene utilizzato il sistema multicanale RHS della INTAN Technologies con 128 sensori di registrazione e stimolazione in parallelo per gestire l'array. Vengono quantificate la baseline del rumore e la risposta a campi elettrici biomimetici generati artificialmente in liquido.

Task 2.2: Sviluppo di un protocollo di misura automatizzato e data pipeline: Viene sviluppato un software per l'automatizzazione di registrazione, stimolazione, trasferimento dati al PC e successiva analisi.

Task 2.3: Algoritmi per la compressione e riduzione dei dati bioelettronici: implementazione di schemi di compressione e di filtraggio delle dinamiche stocastiche e del rumore per estrarre l'algorithmic information content e la intercorrelazione dei dati registrati.

Task 2.4: Algoritmi con AI per feedback control: Viene implementato un feedback controller basato sul machine learning per ottenere una precisa risposta spazio-temporale. Esso sfrutta la capacità di apprendimento e la bassa complessità computazionale dei sistemi basati su reti neurali artificiali come il Radial Basis Function (RBF) network e Reinforcement Learning.

WP3: Dimostrazione in-vitro e in-vivo della registrazione in parallelo e della stimolazione feedback-based (M7-M12)

Task 3.1: Test in-vitro: Viene utilizzato un setup a 128 canali montato su un microscopio invertito per live cell imaging. Si dimostra sia la registrazione di campi elettrici esterni a cellule eccitabili (cardiomiociti e neuroni), sia l'induzione di attività cellulare tramite stimolazione elettrica, sia la possibilità di investigare linee cellulari epiteliali non elettrogeniche mediante metodi impedenziometrici.

Task 3.2: Sistema in-vivo I – EcoG: L'array viene impiantato nella corteccia di ratto per eseguire registrazioni su più canali in cronico, che combinate con pattern di stimolazione permettono di estrarre l'effettiva connettività corticale. Vengono testati elettrodi dotati di spikes per fornire un miglior rapporto segnale-rumore nelle registrazioni grazie alla rottura del tessuto di incapsulamento.

Task 3.3: Sistema in-vivo II – Interfaccia coi nervi periferici: Array più piccoli (N=6) sono attaccati mediante colla incapsulante a piccole terminazioni nervose periferiche legate a processi infiammatori. Viene valutata la fattibilità di esperimenti sia in acuto che in cronico con combinazione di registrazione e stimolazione.

Task 3.4: Dimostrazione della stabilità del feedback: in funzione del successo delle task 3.1 – 3.3 viene realizzato un esperimento per dimostrare la stabilità del feedback control tramite registrazioni da microelectrodes array, analisi dati in tempo reale e adattamento del pattern di stimolazione in base al feedback algorithm. L'obiettivo è quello di avere una risposta precisa e in tempo reale a cambiamenti dell'ambiente e di guidare la risposta del sistema biologico verso l'obiettivo desiderato (come frequenza costante di firing negli esperimenti in vitro o connettività neuronale stabile negli esperimenti in vivo).

WP4: Comunicazione e utilizzo (M1-M12)

Questo WP contiene attività legate all'organizzazione delle risorse, alla comunicazione delle attività e alle interazioni con il pubblico.