

**POLITECNICO DI MILANO**  
**Facoltà di Ingegneria dei Sistemi**



**Corso di Laurea Magistrale in Ingegneria Biomedica**

**Sviluppo e validazione di un front-end multi-canale per l'acquisizione  
di segnali neuronali *in vitro***

Relatore: Prof. Alessandra Pedrocchi

Correlatori: Ing. Emilia Biffi, Ing. Giulia Regalia

**Tesi di Laurea di:**  
**Matteo Capriata**  
**Matricola 770472**

A.A. 2012/2013

# ***INDICE SOMMARIO***

## ***SOMMARIO.....i***

1. INTRODUZIONE ED OBIETTIVI.....i
2. MATERIALI E METODI.....ii
3. RISULTATI E CONCLUSIONI.....iv
4. STRUTTURA DEL LAVORO.....vii

## ***SUMMARY.....ix***

1. INTRODUCTION AND AIM OF THE WORK.....ix
2. MATERIALS AND METHODS.....x
3. RESULTS AND CONCLUSIONS.....xii
4. STRUCTURE OF THE WORK.....xv

# SOMMARIO

## 1. Introduzione ed obiettivi

Lo studio del Sistema Nervoso Centrale si pone come obiettivo la comprensione del funzionamento dei meccanismi neuronali sia in condizioni fisiologiche che patologiche. Attualmente, la sperimentazione *in vitro* rappresenta un approccio sperimentale che offre un interessante livello di indagine, nonostante non riproduca esattamente lo stesso tipo di complessità che caratterizza un cervello *in vivo*. Lo strumento tecnologico che viene spesso utilizzato per lo studio elettrofisiologico di colture neuronali è rappresentato dai MicroElectrode Arrays (MEAs), ovvero matrici di micro-elettrodi in grado di registrare contemporaneamente l'attività bioelettrica da diversi punti di una rete neuronale in modo non invasivo [Morin et al., 2005, Jones et al., 2011].

Tra le numerose applicazioni che sfruttano i MEA, quelle che riguardano lo studio a lungo termine delle proprietà di reti neuronali (ad esempio: plasticità e sviluppo neuronale, effetto cronico di trattamenti farmacologici) soffrono dei limiti imposti dal set-up sperimentale tradizionale. Infatti, questo impone la permanenza delle colture al di fuori dell'incubatore e limita quindi la sopravvivenza cellulare a causa delle fluttuazioni ambientali (temperatura, pH ed osmolarità) e delle perturbazioni a cui le cellule sono sottoposte. Ciò preclude la possibilità di condurre indagini ottiche ed elettrofisiologiche continuativamente su finestre temporali superiori a qualche ora [Biffi et al., 2012].

Per superare queste limitazioni è stata sviluppata presso il NearLab (NeuroEngineering And medical Robotis Laboratory) una camera di incubazione e registrazione portabile in grado di mantenere in condizioni fisiologiche le colture neuronali durante gli esperimenti elettrofisiologici [Biffi et al., 2012]. In un primo prototipo, le registrazioni sono state effettuate connettendo i MEA ad un sistema di acquisizione commerciale, esterno alla camera di incubazione. Con questo setup non è stato possibile ottenere delle registrazioni con qualità (SNR) paragonabile a quelle tradizionali, per via della perdita di segnale dovuta alla mancanza di uno stadio di disaccoppiamento tra i microelettrodi del MEA (ad alta impedenza) e l'elettronica a valle nelle immediate vicinanze del MEA. Per ovviare a tale problema, in un secondo prototipo del sistema, è stata inclusa una scheda di pre-

amplificazione custom, da porre direttamente all'interno della camera ambientale per registrare i segnali da matrici di 60 micro-elettrodi. [Regalia et al., 2012].

Il lavoro presentato in questa tesi rientra nell'ambito della progettazione e validazione di un sistema elettronico multi-canale custom da accoppiare all'attuale prototipo della camera ambientale. Il primo obiettivo del lavoro è stato la validazione scheda di pre-amplificazione interna (già realizzata prima dell'inizio del lavoro di tesi) tramite opportuni test elettronici e registrazioni di segnali reali da colture neuronali. Successivamente, si è progettato e validato il secondo stadio di processing (amplificazione e filtraggio) su una scheda elettronica esterna da posizionare in cascata a quella di pre-amplificazione.

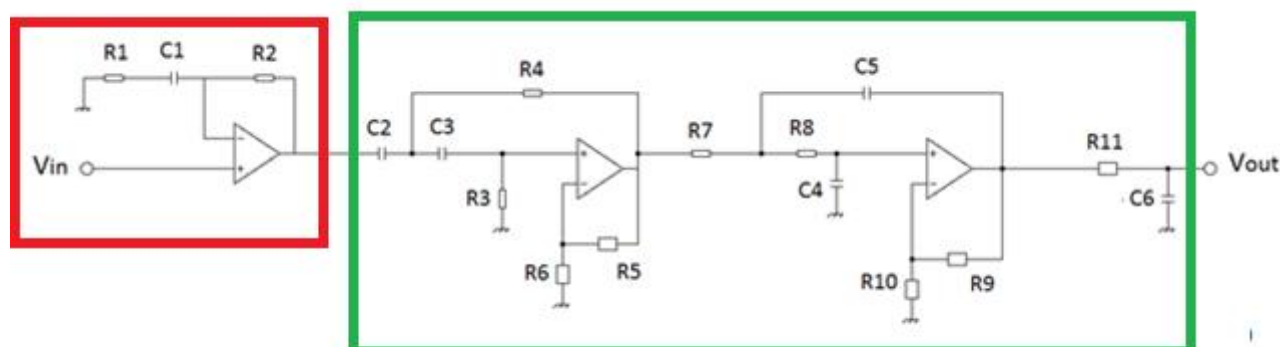
Il lavoro è stato svolto presso il laboratorio NearLab (NeuroEngineering and medicAl Robotics LABoratory) del dipartimento di Elettronica, Informazione e Bioingegneria del Politecnico di Milano e presso il laboratorio Alembic (Advanced light & electron microscopy bio-imaging center) della fondazione San Raffaele del Monte Tabor (Milano).

## 2. Materiali e metodi

Lo stadio di pre-amplificazione dei segnali neuronali rilevati da MEA a 60 elettrodi è stato implementato su due circuiti stampati (PCB) da 30 canali ciascuno. In questo lavoro di tesi, il funzionamento del circuito di pre-amplificazione (guadagno circa 40 dB a partire da 300 Hz), (Figura 1, in rosso) è stato innanzitutto verificato tramite test da laboratorio. Attraverso un generatore di segnali sinusoidali (GFG-8210, Instek) sono stati inviati all'ingresso di ciascun canale segnali con caratteristiche simili a quelle dei segnali neuronali *in vitro* (ampiezza 100  $\mu$ V, banda 300 Hz – 3 kHz). Alimentando le schede con alimentatore da banco (+/- 7 V, GPS-4303, Linear Technology) ed una scheda di conversione analogico-digitale (24 kHz, 16 bit, Ni USB-6009, National Instrument) è stato possibile, tramite software LabView (National Instrument), fare acquisizioni dei segnali in uscita a tutti i 60 canali delle schede di pre-amplificazione. Dai segnali acquisiti è stato ricavato il modulo del guadagno del circuito in funzione della frequenza, mediante l'utilizzo di un algoritmo che ricerca il massimo nella densità spettrale di potenza in un range definito dall'utente (implementato in Matlab). Tale risposta è stata confrontata con quella simulata (software LTSpice) per evidenziare eventuali anomalie non considerate in fase di progettazione. Sono inoltre stati calcolati i valori di noise per ingressi collegati a massa

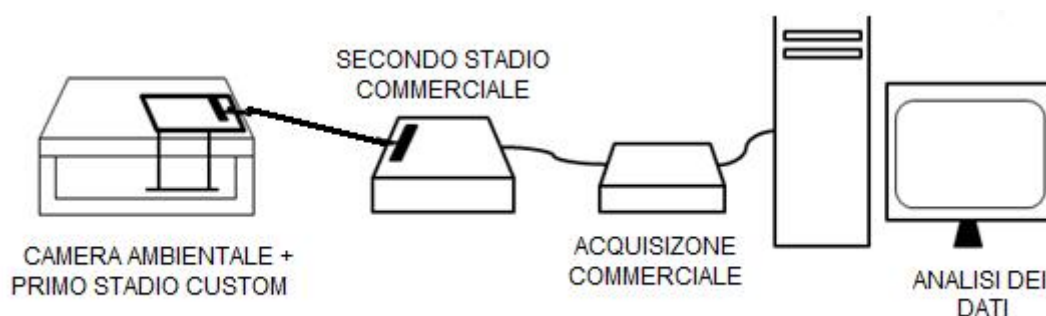
(Input e Output referred Noise test) e cercate eventuali anomalie di cross talk tra piste vicine (Cross Talk test).

La fase di progettazione delle schede di amplificazione e filtraggio dei 60 canali in uscita allo stadio di pre-amplificazione e da porsi esternamente alla camera di coltura è stata condotta in due tempi. A partire da una topologia circuitale precedentemente definita (filtro passa alto attivo del secondo ordine, filtro passa basso attivo del secondo ordine, entrambi di tipo Butterworth, e filtro passa basso passivo) (Figura 1, verde), sono stati calcolati i valori di capacità e resistenze per rispondere alle specifiche di guadagno (circa 22 dB) e banda (300 – 3000 Hz), con l'ausilio del software FilterPro (Texas Instruments). Le prestazioni del circuito sono state simulate tramite il software LTSpice. In seguito, si è passati alla vera e propria fase di progettazione CAD, tramite il software EAGLE (Cadsoft). Lo stadio per 60 canali è stato implementato su due schede identiche da 30 canali. Sono stati tenuti in conto eventuali fattori che avrebbero potuto degradarne le prestazioni (ad esempio, accoppiamenti capacitivi, acid traps, etc). Per minimizzare il numero di componenti e la loro occupazione fisica, sono stati utilizzati quad-operational amplifiers a montaggio superficiale e componenti passivi 0603. Dopo la realizzazione delle PCB e l'assemblaggio dei componenti (realizzato presso una ditta esterna), si è passati alla fase di test di queste schede, onde verificare eventuali anomalie elettriche nonché la corrispondenza tra caratteristiche simulate e misurate.



**Figura 1.** Struttura del completo set-up elettronico, formata dallo stadio di pre-amplificazione (incorniciato in rosso), implementato nelle PCB interne, e dallo stadio di amplificazione e filtraggio (incorniciato in verde), implementato sulle PCB esterne.

Parallelamente alla fase di sviluppo del secondo stadio sulle PCB custom, è stata svolta una fase sperimentale in cui si sono registrati segnali reali da colture neuronali su MEA tramite le schede di pre-amplificazione interne e schede di filtraggio e acquisizione commerciali. Le colture neuronali ottenute utilizzate in questa fase sono state ottenute a partire da cellule ippocampali di embrioni di topo, secondo protocolli standard [Biffi et al., 2012]. Le prime registrazioni sono state effettuate per periodi di tempo brevi (fuori dalla camera di incubazione), per confrontare le caratteristiche dei segnali neuronali registrati con le schede custom ed un sistema commerciale (MultiChannel Systems GmbH, MCS), valutando parametri quali frequenza di sparo e rapporto segnale rumore (SNR). I dati sono stati acquisiti con il software Mc\_Rack (MCS) ed analizzati con algoritmi in Excel e Matlab. Successivamente, sono state effettuate registrazioni all'interno della camera di incubazione, prolungate a diverse ore, per verificare il vantaggio del sistema proposto. Il setup sperimentale di queste prove è rappresentato in Figura 2.

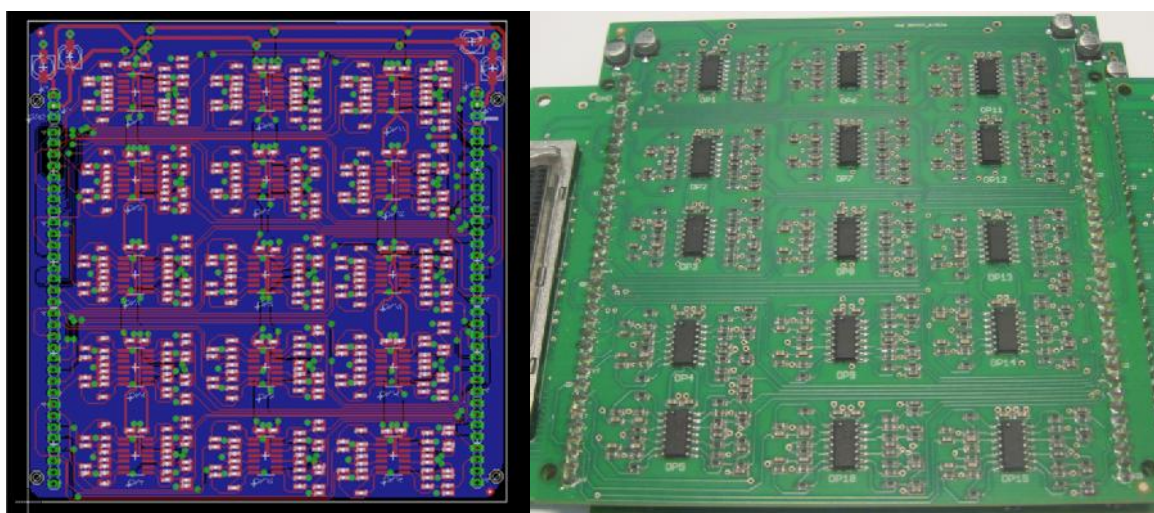


**Figura 2.** Set-up sperimentale utilizzato in fase di registrazione dell'attività delle cellule.

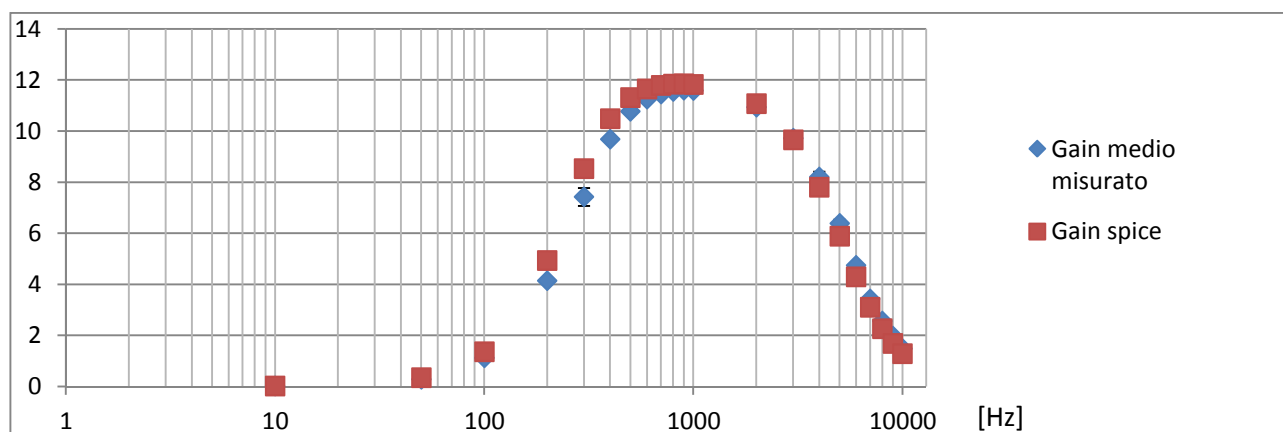
### 3. Risultati e conclusioni

Per quanto riguarda la validazione delle schede di pre-amplificazione, i test da laboratorio hanno mostrato in generale una buona aderenza tra le specifiche di progetto e le misure effettuate. In particolare, la risposta in frequenza misurata è paragonabile a quella attesa ed i valori di rumore di ogni canale e di rumore di cross-talk sono risultati inferiori al rumore in ingresso dovuto ai microelettrodi (circa 5  $\mu\text{V}$  RMS) e paragonabili ad altri setup per segnali neuronali da MEA [Rolston et al., 2009].

Riguardo la progettazione del secondo stadio del front-end, simulazioni e prove sperimentali su un canale hanno confermato l'adeguatezza di un guadagno complessivo di circa 20 dB e una banda di 300 Hz - 5 kHz per la topologia scelta. Riguardo al layout delle PCB, è stato definito un disegno tale da minimizzare i cross-talk e privilegiare la comparabilità tra i canali (Figura 3). Il funzionamento delle schede è stato verificato dai test elettronici, che hanno mostrato un guadagno ben comparabile a quello simulato (Figura 4) ed un rumore elettronico inferiore rispetto al primo stadio. Tutte le analisi hanno poi mostrato una comparabilità tra i diversi canali testati.



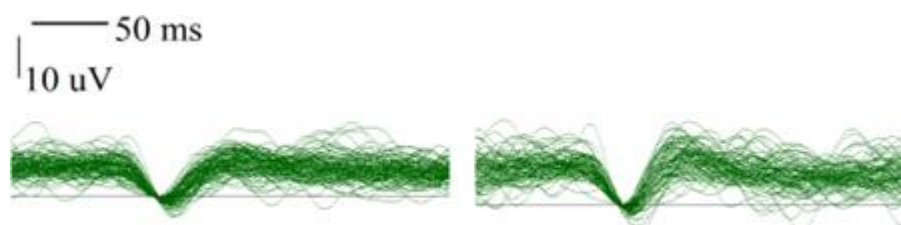
**Figura 3.** Layout delle schede di amplificazione e filtraggio esterne (sinistra) e foto della PCB una volta realizzata (destra).



**Figura 4.** Diagramma di Bode del guadagno simulato e misurato delle PCB di amplificazione esterne.

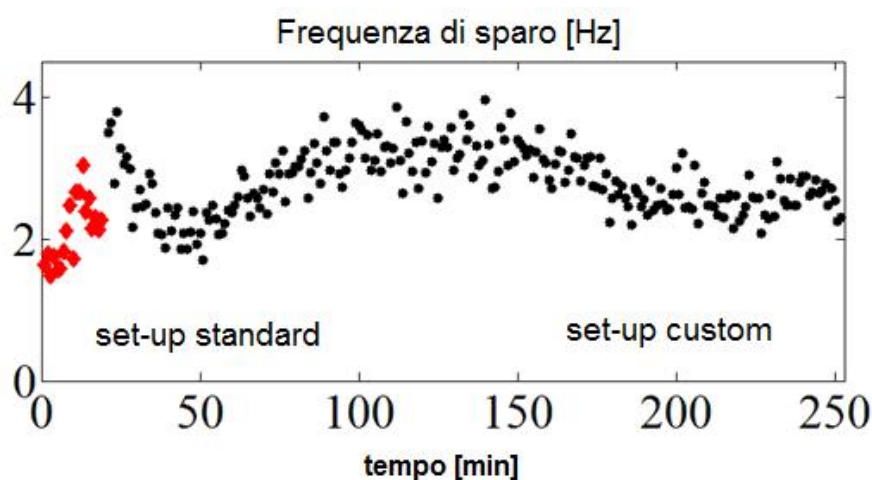
La fase sperimentale della tesi ha permesso di valutare il funzionamento delle schede di pre-amplificazione integrate nella camera ambientale e connesse a MEA. Le registrazioni sul breve periodo (intorno a 60 secondi) hanno mostrato la comparabilità della forma

d'onda degli spike (tipicamente bifasica nei segnali neuronali *in vitro*) rilevati dal pre-amplificatore custom e da quello commerciale (Figura 5). Anche la frequenza media di sparo ed il rapporto segnale rumore (SNR) sono risultati comparabili nei due setup (1.5 Hz per il set-up custom e 2.5 Hz per quello commerciale, 5.40 dB per il set-up custom e 5.46 dB per il set-up commerciale, rispettivamente).



**Figura 5.** Confronto di forme d'onda degli spike registrate dagli stessi microelettrodi e dalla stessa coltura con il set-up commerciale (sinistra) e quello custom (destra).

La verifica della capacità della camera di provvedere a un adeguato ambiente fisiologico per le colture è stata invece eseguita tramite le registrazioni di lungo periodo (> 3 ore). La Figura 6 riporta il principale risultato ottenuto da questi test: la frequenza di sparo di una coltura ippocampale, registrata brevemente prima nel setup commerciale e poi per diverse ore nella camera ambientale, è rimasta stabile una volta fatto lo scambio di locazione ( $2.6 \text{ Hz} \pm 0.78 \text{ Hz}$ ). Il valore di frequenza è risultato comparabile con registrazioni a breve termine riportate in letteratura per lo stesso tipo di colture [Gavello et al., 2012; Boehler et al., 2012] supportando la tesi che le colture non subiscono un declino di vitalità all'interno della camera di controllo ambientale.



**Figura 6.** Frequenza di sparo di una coltura neuronale registrata per i primi 20 minuti con il set-up standard e successivamente tramite set-up custom. Sono riportati i valori medi di frequenza in intervalli temporali di 1 minuto.



In conclusione, in questo lavoro di tesi si è dimostrata la validità del front-end elettronico multi-canale proposto per esperimenti elettrofisiologici su colture neuronali. Inoltre, si sono effettuati esperimenti preliminari che hanno attestato il vantaggio di una piattaforma sperimentale compatta in grado sia di coltivare neuroni in ambiente fisiologico sia di monitorarne l'attività continuamente su finestre temporali estese. A livello applicativo, tale set-up permette di indagare fenomeni con dinamiche lente quale l'effetto di trattamenti farmacologici cronici sull'attività bioelettrica delle colture [Morefield et al., 2000; Howell et al., 2011] e in particolare sulla correlazione tra l'utilizzo di farmaci e neurotossicità [Scelfo et al., 2012]. Inoltre sarebbe possibile approfondire studi riguardanti la modulazione dell'attività elettrica durante lo sviluppo e la plasticità neuronale.

## 4. Struttura del lavoro

Nell'**introduzione** si presentano i vantaggi della sperimentazione su neuroni *in vitro* con Micro-Electrode Array (MEA), rispetto alle tecniche elettrofisiologiche tradizionali, evidenziando il loro vantaggio applicativo. Si descrivono poi le limitazioni dei set-up tradizionali e i motivi che hanno portato il NearLab a sviluppare una propria camera di coltura.

Nel **capitolo 1** si riporta lo stato attuale dell'arte prendendo in considerazione anche l'intero sistema di incubazione e registrazione di colture neuronali sviluppato al NearLab confrontandolo con il sistema commerciale della MultiChannels System (MCS) ed evidenziando le limitazioni che hanno portato allo sviluppo di questa tesi.

Nel **capitolo 2** si riporta il protocollo sperimentale adottato per testare la scheda di pre-amplificazione e se ne riportano i risultati.

Nel **capitolo 3** si discute la scelta del guadagno della successiva scheda di amplificazione e filtraggio mediante prove sperimentali su breadboard. Si descrivono inoltre le strategie per la progettazione CAD di una PCB di amplificazione performante nonché le problematiche affrontate per minimizzare possibili disturbi elettrici. Infine si riportano i risultati dei test di validazione della scheda.

Il **capitolo 4** presenta i risultati di una registrazione sperimentale del segnale elettrofisiologico di una coltura neuronale eseguita con il set-up custom (solo con schede

di pre-amplificazione) e si riportano i risultati del confronto con il sistema commerciale MCS.

Nel **capitolo 5** vengono presentate le conclusioni e i possibili sviluppi futuri a questa tesi.

# ***SUMMARY***

## **1. Introduction and aim of the work**

The aim of the study of the Central Nervous System is to understand the working principles of neuronal networks both in physiological and pathological condition. Nowadays, the *in vitro* experimental represents an interesting level of investigation, although it doesn't reply the same complexity that is typical of a *in vivo* brain. MicroElectrode Arrays (MEAs) represent the technological tool that is usually used for the electrophysiological study of neuronal cultures; MEAs are micro-electrodes arrays that record simultaneously the bioelectrical activity in different points of a neuronal network in a non invasive way [Morin et al., 2005, Jones et al., 2011].

Among the various applications that exploit MEAs, those who concern the long term study of neuronal network properties (e.g., plasticity and neuronal development, chronic effect of pharmacological treatments) suffer for limitations due to the traditional experimental set-up. Indeed, this set-up imposes to keep the cells outside the incubator during recordings and decreases the cellular viability due to environmental fluctuations (temperature, pH and osmolarity). These limitations prevent from optical and electrophysiological investigations for time periods longer than a couple of hours [Biffi et al., 2012].

To overcome these problems, NearLab laboratory (NeuroEngineering And medical Robotics Laboratory) has developed a portable environmental and recording chamber equipped to maintain neuronal cultures in physiological conditions during the electrophysiological experiments [Biffi et al., 2012]. In a first prototype, recordings were realized linking MEA to a commercial acquisition system deposited outside the incubating chamber. Using this setup, it wasn't possible to perform recordings with SNR similar to those obtained by the traditional setup, due to the loss of signal caused by the lack of a decoupling stage between microelectrodes (with high impedance) and the following electronics. To overcome this problem, a second prototype of the system was developed,

embedding a pre-amplification stage located directly inside the environmental chamber for recording 60 signals [Regalia et al., 2012].

The work here represented is meant to be placed in the design and validation setting of a multi-channel custom electronic that will be coupled to the current prototype of the environmental chamber. The first aim was the validation of the pre-amplification boards (realized before this thesis), through specific electronic tests and the recording of real signals from neuronal cultures. Then, a second processing stage (amplification and filtering) has been designed, realized and tested. This was realized in order to be suitably coupled with the pre-amplification boards and to be implemented on external boards serially connected to the internal ones.

This work was developed at Nearlab (NeuroEngineering and medical Robotics Laboratory), Electronic, Information and Bioengineering Department of Politecnico di Milano, and at Alembic (Advanced light & electron microscopy bio-imaging center) laboratory, San Raffaele del Monte Tabor foundation (Milano).

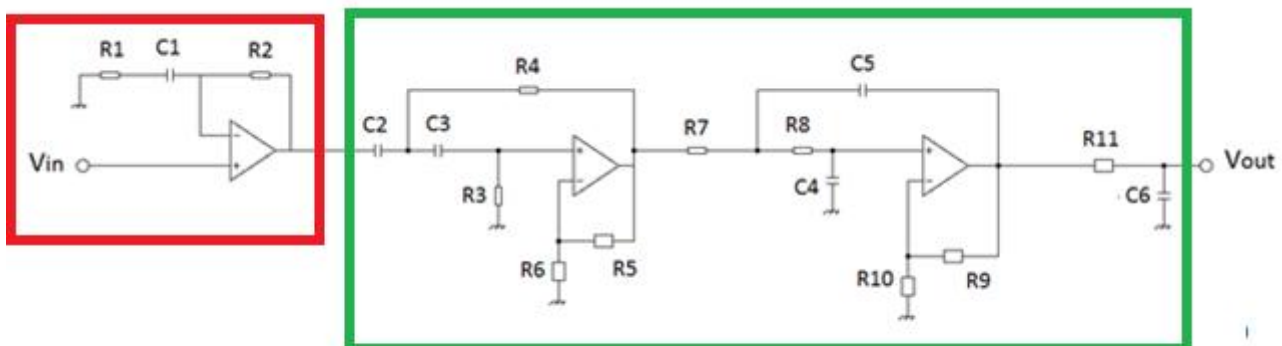
## 2. Materials and methods

The pre-amplification stage for 60 channel MEAs had been previously implemented on two PCBs (Printed Circuit Board), each composed by 30 channels. In this thesis, the correct working of the pre-amplification circuit (gain about 40 dB starting from 300 Hz) was verified by laboratory test (Figure 1, red framed).

Through a sinusoidal signal generator (GFG-8210, Instek) signals with features similar to *in vitro* neuronal spike (100  $\mu$ V amplitude, bandwidth 300 Hz – 3 kHz) were sent to the board input channels. Boards were supplied with a power supply ( $\pm 7$  V, GPS-4303, Linear Technology) and data were collected with a data acquisition card (24 kHz, 16 bit, Ni USB-6009, National Instrument) and Labview software (National Instrumental), from each one of the 60 channels.. These acquired signals were processed in order to evaluate the gain (frequency dependent) of the circuit by a custom algorithm that computes the PSD (Power Spectral Density) of input and output waves. This gain was then compared with the simulation obtained by software LTspice in order to highlight possible abnormalities not

considered during the design phase. Were also performed Input and Output referred Noise test to check noise levels and Cross talk test to evaluate cross talk between closed tracks.

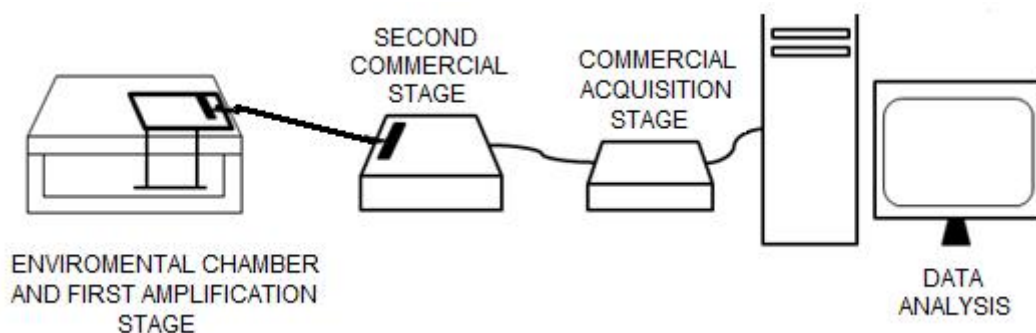
The design phase of the external amplification and filtering boards was performed in two steps. Starting from a topology circuit defined before (second order high pass Butterworth filter and second order low pass Butterworth filter, and a passive low pass filter) (Figure 1, green framed), the values of passive components were computed to satisfy design constraints (gain around 20 dB and bandwidth around 300 – 3000 Hz), through FilterPro software (Texas Instruments). Circuit performances were simulated through LTSpice software (Texas Instruments). Then, CAD design was performed through EAGLE software (Cadsoft). The 60 channels amplification and filtering stage was implemented on two identical PCBs (30 channels each). The final layout was achieved considering various factors that could deteriorate board performances (e.g., capacitive coupling, acid traps). To minimize the number of components and their physical occupation, quad-operation surface mount amplifiers have been used. After PCB realization and components mounting (by external companies) of the test of the boards was performed, in order to identify possible abnormalities and check the equivalence between simulated and measured features.



**Figure 1.** Structure of the completed electronic set-up, formed by the pre-amplification stage (red framed), implemented on internal PCBs, and the amplification and filtering stage (green framed), implemented on external PCBs.

During the second stage development, simultaneous experimental tests on pre-amplification boards were conducted using neuronal cultures grown on MEAs. The neuronal cultures used in this phase were obtained by hippocampal embryonic mice cells, with standard protocols [Biffi et al., 2012]. First recordings were performed for short time periods (outside the environmental chamber), in order to compare features of neuronal signals recorded with the custom boards with signals recorded by a commercial pre-

amplifier, evaluating parameters like spiking rate and signal-to-noise ratio (SNR). Data were acquired with MC Rack software (MCS) and analyzed with Excel and Matlab algorithms. Then, recording inside the environmental chamber were performed for longer time periods, in order to assess the advantage of the experimental platform in long term experiments. The experimental setup used in these tests is represented in Figure 2.

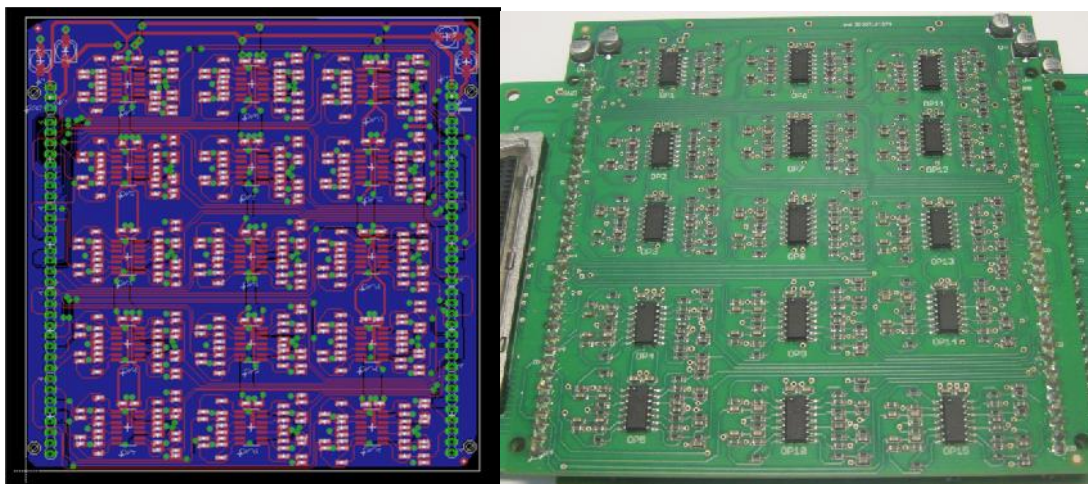


**Figure 2.** Experimental setup used during recordings of neuronal cells activity.

### 3. Results and conclusions

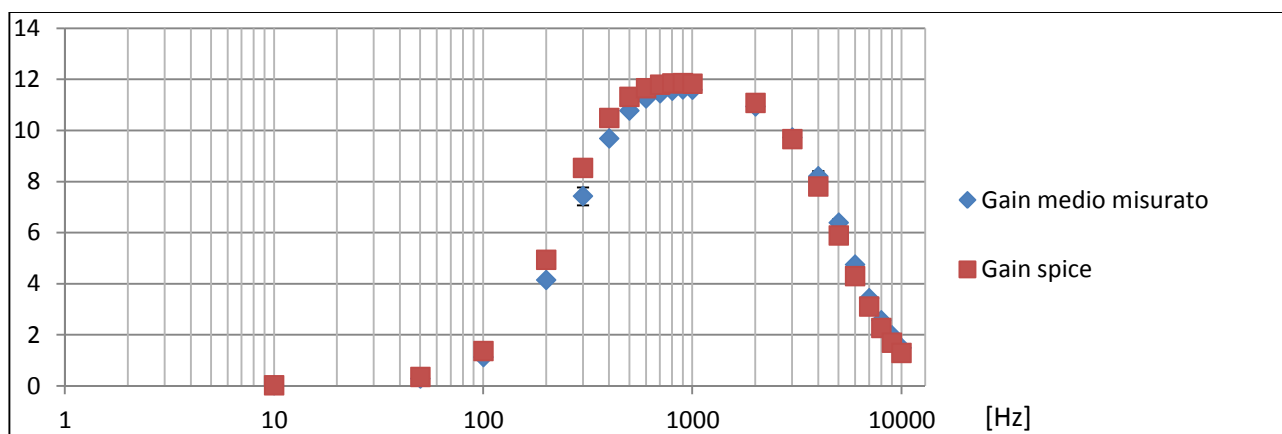
Tests performed to validate the pre-amplification boards showed a satisfactory similarity between design specifications and real performances. In particular, the measured frequency response compares well with the simulated one. Single channel noise and cross-talk values are lower than input noise caused by microelectrodes (about 5  $\mu\text{V}$  RMS) and comparable to other setups used for MEA neuronal signals [Rolston et al., 2009].

Regarding the second front-end stage, simulations and experimental test on a prototypal single channel confirmed that a total gain of about 20 dB and a bandwidth of 300 Hz – 5 kHz are adequate for the purposes. Considering PCB CAD design, the defined layout was chosen in order to minimize cross-talk and make the different channels comparable (Figure 3). The performances of the realized PCBs were verified by electronic tests. Indeed, they showed a gain comparable to the simulated one (Figure 4) and an electronic noise lower than the first stage noise. All the analysis demonstrated comparability between all the tested channels.



**Figure 3.** Amplification and filtering board layout (left) and PCB realized (right).

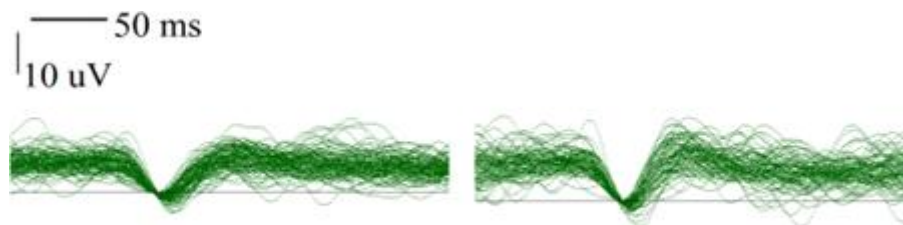
The experimental phase demonstrated the functioning of the pre-amplification boards integrated inside the environmental chamber and linked to MEAs. Short time recordings (around 60 seconds) showed comparability of spike wave shape (typically biphasic for *in vitro* neuronal signals) between custom and commercial pre-amplification system (Figure 5). Also, averaged spiked rate and signal-to-noise ratio (SNR) resulted comparable between the two systems (1.5 Hz for the custom setup and 2.5 Hz for the commercial one, 5.40 dB for the custom setup and 5.46 dB for the commercial one, respectively)



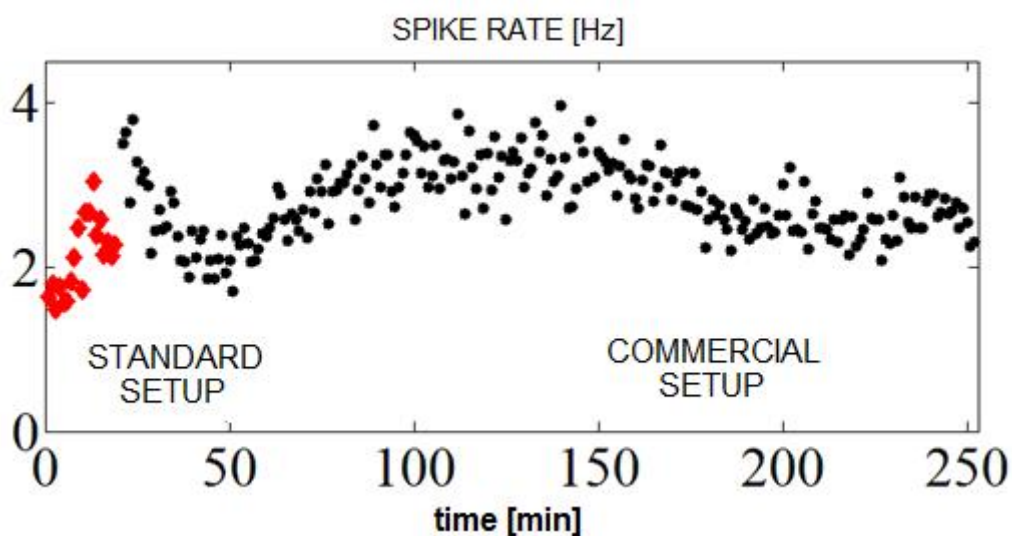
**Figure 4.** Bode diagram of simulated and measured external PCB gain.

The ability of the environmental chamber to provide a physiological environment for cultures was tested through longer recordings (> 3 hours). Figure 6 reports the main result obtained from these tests: the spike rate of a hippocampal culture on MEA, initially recorded briefly with the commercial pre-amplifier stage and then for some hours inside the environmental chamber with the custom boards, displayed a stable time profile even

after the displacement ( $2.6 \text{ Hz} \pm 0.78 \text{ Hz}$ ). The frequency value is comparable with short recordings of the same type of cultures reported in the literature [Gavello et al., 2012; Boehler et al., 2012], confirming the thesis that the cells vitality inside the environmental chamber does not decrease.



**Figure 5.** Comparison of shape wave spikes recorded by same cultures and microelectrodes with commercial set-up (left pic) and custom one (right pic).



**Figure 6.** Spike rate of a neuronal culture recorded 20 minutes with standard set-up and then with the custom one. Values averaged for temporal period of 1 minute are reported.

To conclude, the validation of the multi-channel front-end electronics aimed at electrophysiological experiments from neuronal cultures was demonstrated in this thesis. Indeed, preliminary experiments to certify the advantages of a compact experimental platform able to grow neuronal networks in a physiological environment and to record their activity for long period time were performed.



Thanks to the possibility to perform long experiments, the whole system will be useful to detect slow dynamic events like pharmacological chronic effects on *in vitro* bioelectrical activity [Morefield et al., 2000; Howell et al., 2011]. Moreover, it could be used to continuously follow the development of physiological or pathological neuronal networks.

### 3. Structure of the work

In the **introduction** the advantages of neuronal *in vitro* experimentation with Micro-Electrode Array (MEA) are shown, and they are compared with traditional electrophysiological technologies. Then, the problems of the traditional setup are explained and the reasons why NearLab started to develop a custom environmental and recording chamber are shown.

In **chapter 1** the actual state of the art is displayed, considering also the entire incubation and recording system for neuronal cultures developed at NearLab, comparing it with the commercial recording stage (MultiChannelsSystem,MCS) and highlighting the drawbacks that this thesis try to solve.

In **chapter 2** the experimental protocols adopted to test the pre-amplification boards are described and the results are reported.

In **chapter 3**, the choice of a suitable gain for the amplification and filtering boards is discussed, through experimental trials on breadboard and simulations. Strategies adopted for CAD design of amplification and filtering boards are described, highlighting also ways to minimize possible electric noise and performances degradation. Eventually, results about the electronic tests are reported.

In **chapter 4** the experimental recording tests with neuronal cultures are described and results are reported, comparing the signals recorded with the custom setup and the ones recorded with MCS commercial system.

In **chapter 5** conclusions and possible future developments are reported.

# ***INDICE***

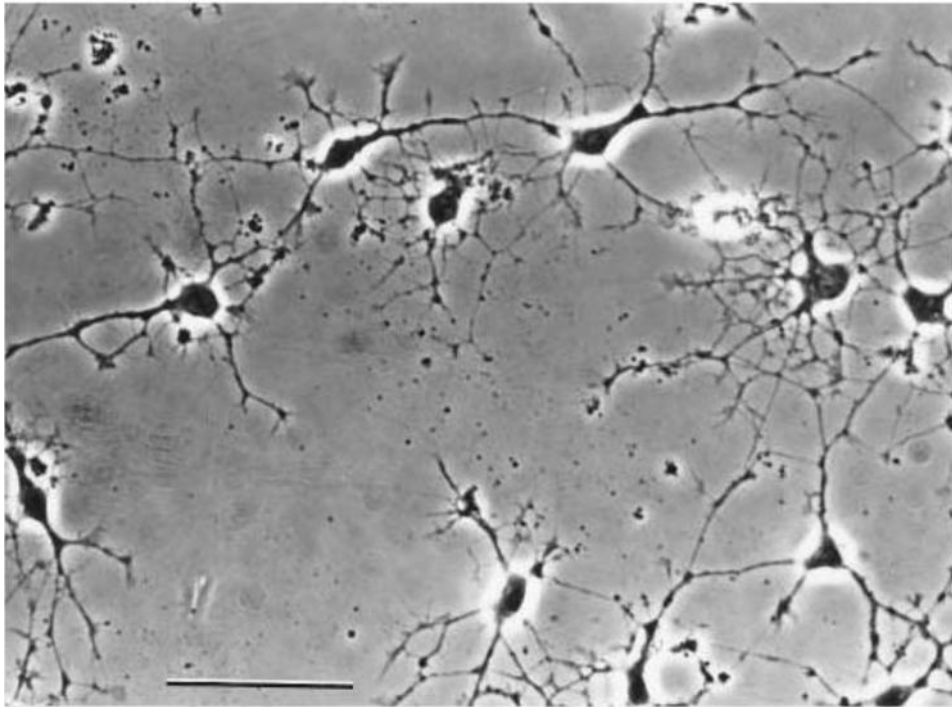
Introduzione .....	1
Capitolo 1: Stato dell' arte .....	9
1.1 Sistemi custom di registrazione dell'attività elettrica mediante MEA ..	9
1.2 Descrizione del set-up sviluppato al NearLab .....	16
Capitolo 2: Validazione della scheda di pre-amplificazione .....	22
2.1 Protocollo sperimentale .....	22
2.2 Risultati.....	25
2.3 Caratterizzazione del setup costituito da scheda di pre- amplificazione ed amplificatore commerciale .....	29
Capitolo 3: Progettazione scheda di amplificazione.....	33
3.1 Progettazione circuito di amplificazione e filtraggio per un canale....	33
3.2 Simulazione in Spice e implementazione singolo canale su bread board .....	38
3.3 Progettazione CAD delle schede di amplificazione e filtraggio a 60 canali .....	39
3.4 Validazione delle schede esterne di amplificazione e filtraggio a 60 canali .....	45
3.4.1 Risultati .....	46
Capitolo 4: Registrazione segnale elettrico durante attività fisiologica con set-up custom .....	48
4.1 Descrizione protocollo di coltura e di registrazione.....	48
4.2 Validazione delle schede di pre-amplificazione con cellule .....	51

4.3 Validazione della piattaforma sperimentale per registrazioni a lungo termine .....	52
Capitolo 5: Discussione e sviluppi futuri.....	54
5.1 Discussione .....	54
5.2 Sviluppi futuri .....	58
Bibliografia .....	60

# ***INTRODUZIONE***

Il cervello dei mammiferi è senza dubbio l'organo più complesso; la sua complessità è dovuta principalmente alla molteplicità di connessioni dinamiche con cui gli oltre cento miliardi di cellule comunicano tra loro. E' dunque chiaro che nell'ambito della Neuroscienza è costante lo sforzo di trovare un metodo in grado di osservare e spiegare tale complessità. Nell'ultimo secolo, molti sono stati i tentativi di studio sia in condizioni fisiologiche che patologiche, sia attraverso studi *in vivo* dell'animale in esame che *in vitro* di porzioni del suo Sistema Nervoso. In particolare, lo studio *in vitro* permette un'indagine semplificata rispetto allo studio *in vivo* ma comunque coerente e rimane pertanto un ottimo punto di partenza per l'indagine del Sistema Nervoso Centrale (SNC).

Questo approccio sperimentale prevede la produzione di colture cellulari a partire da cellule nervose di animale e loro deposizione in camere di coltura in grado di garantire un ambiente adatto per la loro crescita fisiologica. Questa è caratterizzata dalla creazione di una fitta rete cellulare con caratteristiche biochimiche ed elettrofisiologiche simili al sistema d'origine (Figura 1, [Brewer, 1997]) ed è accompagnata dalla presenza di un'attività elettrica extra-cellulare costituita da singoli potenziali d'azione (PA), rapide sequenze di PA (*burst*) ed episodi di attività collettiva che coinvolgono l'intera coltura (*network burst*) [Maeda et al., 1995; O'Donovan, 1999; Wagenaar et al., 2006]. Dunque, lo studio *in vitro*, nonostante rilevabili differenze rispetto al sistema più complesso *in vivo*, rappresenta un metodo per rispondere a quesiti fisiologicamente rilevanti a livello cellulare ed a livello di rete, permettendo di comprendere approfonditamente il funzionamento del cervello. Tale sistema riporta, oltretutto, dei vantaggi come la maggiore accessibilità dei dati grazie al controllo dell'ambiente di coltura e diminuisce enormemente l'ambiguità nell'interpretazione della risposta a stimoli esterni e dei target cellulari di sostanze chimiche [Brewer, 1997]. Infine permette una indagine elettrofisiologica a diverse scale di grandezza, ossia permette di osservare sia i meccanismi della singola cellula che dell'attività congiunta di più neuroni.



**Figura 1.** Coltura di neuroni ippocampali di ratto fotografata dopo 3 settimane *in vitro* [Brewer, 1997]. Si possono osservare gli assoni utilizzati dai neuroni per connettersi tra di loro. Barra = 50 $\mu$ m

Attualmente la tecnica utilizzata per lo studio di una singola cellula posta in una coltura neuronale è il *patch clamp*; essa prevede di misurare, mediante microelettrodi, le correnti ioniche dei singoli canali di membrana e le modifiche del potenziale di membrana che esse inducono. Ciò va a vantaggio della selettività permettendo di studiare accuratamente la singola cellula.

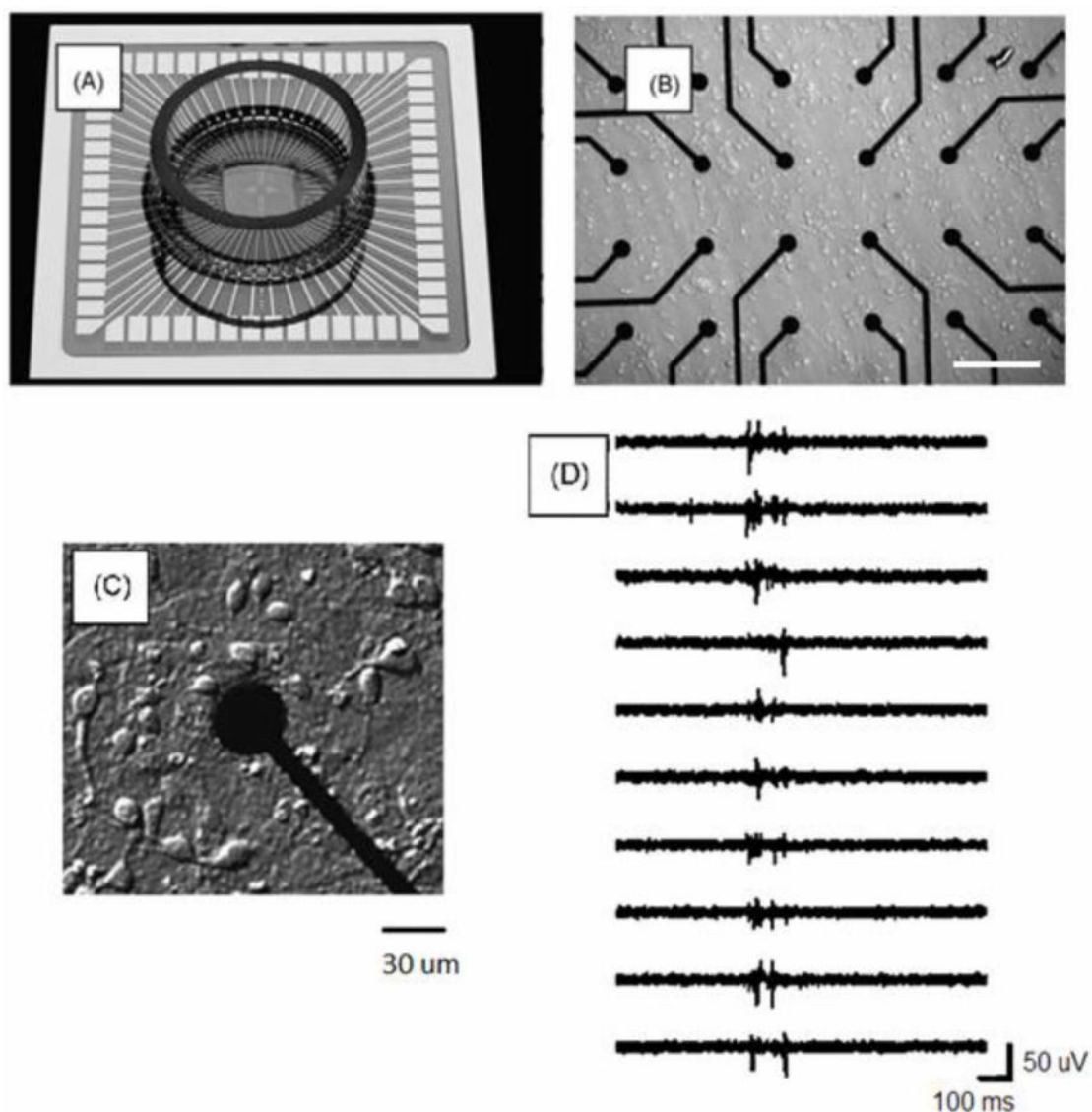
Lo svantaggio di questa tecnica è però l'invasività dato che il microelettrodo viene posto direttamente a contatto con il citoplasma cellulare. Inoltre, le tempistiche richieste per il posizionamento dei micro-elettrodi sono elevate. Infine ci sono limiti intrinseci che caratterizzano questa tecnica: lo studio di un singolo neurone, infatti, non è adeguato per comprendere le interazioni di una fitta rete cellulare quale è quella di una coltura neuronale in cui ogni cellula è in grado di interagire, attraverso le sinapsi, con molte altre cellule.

L'approccio *in vitro* si è dunque spostato verso metodi che permettano lo studio di una intera rete cellulare (o almeno una sua parte) piuttosto che di un suo singolo membro. Per superare queste limitazioni i progressi della microtecnologia hanno permesso di sviluppare matrici di microelettrodi (i.e. Micro-Electrode Arrays, MEAs), ovvero un' interfaccia in grado di indagare non invasivamente l'elettrofisiologia extracellulare di reti neuronali mediante registrazioni multicanale ad elevata risoluzione temporale [Gross, 1979; Morin et al., 2005].

I MEA sono matrici di microelettrodi planari in metallo (solitamente 60 ma possono arrivare anche a 256), con diametro tra 10 e 100  $\mu\text{m}$  e distanza tra gli elettrodi tra 100 e 450  $\mu\text{m}$ . Il metallo utilizzato deve avere buona conducibilità elettrica (vengono di solito utilizzati oro, palladio o ossido di indio e stagno). Generalmente sono disposti su un substrato isolante in vetro e sopra di essi viene coltivata la rete neuronale, accolta all'interno di una camera circolare in vetro o plastica (Figura 2A). Gli elettrodi sono organizzati in una griglia che effettua un campionamento spaziale dell'attività complessiva della coltura (Figura 2B). Infatti ogni micro-elettrodo registra un segnale extracellulare (ampio da decine a centinaia di  $\mu\text{V}$ ) risultato della somministrazione delle singole attività dei neuroni posti nella porzione di rete vicina ad esso (Figura 2C e D). Infine essi sono in grado di interagire attivamente con la coltura stimolandola mediante impulsi elettrici.

I MEA sono posizionabili all'interno di incubatori in modo da far crescere colture neuronali in un ambiente fisiologico. Grazie alla possibilità di registrare l'attività elettrica simultaneamente da diversi siti, i MEA rappresentano uno strumento ideale per esplorare le dinamiche di rete [Morin et al., 2005, Hales et al., 2010, Jones et al., 2011]. In particolare, le reti di neuroni cresciuti su MEA rappresentano un modello neurobiologico semplice e facilmente accessibile per comprendere i meccanismi della comunicazione neurale, lo scambio di informazioni in una rete e studiarne le connettività [Hales et al., 2010].

Tutti questi punti di forza rendono i MEA utili in un'ampia gamma di applicazioni nel campo della Neuroscienza, tra cui lo studio di come popolazioni di neuroni codificano l'informazione [Potter, 2001], l'analisi delle caratteristiche dell'attività di reti neuronali durante la maturazione della rete [Beggs and Plenz, 2003, Pelt et al., 2004, Chiappalone et al., 2006], lo studio della plasticità neuronale e dei meccanismi di apprendimento [Shahaf and Marom, 2001; Eytan et al., 2003; Wagenaar 2006; Hoffmann and Bading, 2006; Bakkum et al., 2008; Chiappalone et al., 2008] e di quelli coinvolti nella memoria [Shimono et al., 2002]. Per quanto concerne l'ambito diagnostico e terapeutico, i MEA sono impiegati come piattaforme farmacologiche e tossicologiche per esplorare gli effetti di molecole neuroattive sull'attività spontanea di reti [Gross, 1997; Morefield et al., 2000; Gramowski et al., 2004; Stett et al., 2003; Chiappalone et al., 2007; Xiang et al., 2007; Johnstone et al., 2010].



**Figura 2.** (A) Immagine di un Micro-Electrode Array (MEA) [Johnstone et al., 2010] (B) Fotomicrografia di cellule neuronali da ratto cresciute su MEA [Johnstone et al., 2010]. Gli elettrodi sono, in questo caso, circolari (diametro 30  $\mu\text{m}$ ) e distano 200  $\mu\text{m}$ . Le linee che partono dagli elettrodi sono le piste conduttrici che portano agli amplificatori. Scala: 200  $\mu\text{m}$ . (C) Ingrandimento di un micro-elettrodo e delle cellule neuronali nelle sue vicinanze. (D) Esempio di attività elettrica registrata da diversi canali di un MEA.

Inoltre è possibile indagare le alterazioni funzionali associate ad una patologia se le colture cresciute su MEA sono ottenute da modelli animali di patologie del SNC; da ciò derivano gli studi per il trattamento di numerosi disfunzioni quali l'Alzheimer o l'epilessia [Faingold, 2004, Hakkoum et al., 2007, Jones et al., 2011]. Tutte queste implicazioni hanno portato allo sviluppo di numerosi sistemi commerciali in grado di stimolare neuroni cresciuti su MEA o registrarne l'attività spontanea (Multi Channel System GmbH, MCS, Germania, Figura 3; Panasonic Inc., Giappone).



**Figura 3.** Sistema commerciale USB-MEA1060 (Multi Channel Systems GmbH), per amplificare, filtrare e convertire in digitale i segnali dai 60 canali di un MEA, controllando anche la temperatura delle cellule durante le registrazioni. Il sistema include anche un software per una preliminare analisi dei dati.

Nonostante l'ampia gamma di sistemi commerciali i limiti intrinseci della tecnica di coltura tradizionale e del set-up sperimentale comunemente utilizzato riducono la longevità e la vitalità delle colture cellulari.

Le caratteristiche fondamentali per mantenere vitali le colture sono la temperatura intorno a 37°C, il pH controllato tra 7.3 e 7.5 e l'osmolarità costante [Mains and Patterson, 1978, Brewer, 1997]. Per stabilizzare il pH, l'incubatore mantiene un'atmosfera al 5% di CO<sub>2</sub> che si bilancia aggiungendo bicarbonato al mezzo di coltura. L'osmolarità viene mantenuta saturando di vapor d'acqua l'aria dell'incubatore per evitare l'evaporazione del terreno di coltura. Oltre a ciò, è necessario mantenere le cellule in un terreno di coltura fisiologico per lo sviluppo, che contenga i fattori per la crescita e l'omeostasi. Infine, è richiesta la maggior astaticità possibile all'interno delle colture e tramite l'utilizzo di un opportuno sistema di ventilazione, l'aria viene filtrata per evitare il contatto tra cellule e microrganismi patogeni che, in un ambiente caldo e umido come questo, potrebbero facilmente proliferare.

L'idealità di tali considerazioni sulle condizioni ambientali si scontra però con la realtà di un laboratorio e degli operatori che lo utilizzano. Infatti gli incubatori vengono aperti più volte nell'arco di una giornata cambiando le condizioni imposte e determinando dunque una



diminuzione, seppur temporanea, della temperatura, creando una via di ingresso a possibili microrganismi patogeni e sostituendo l'aria umida fisiologica con l'aria secca ambientale [Potter and DeMarse, 2001]. Dunque il livello medio di umidità relativa risulta inferiore a quello ideale (ovvero il 100%) provocando un aumento di osmolarità molto nociva per la longevità cellulare [Potter and DeMarse 2001; Blau et al., 2009]. Inoltre, il prelievo delle colture per cambiare il mezzo, registrare l'attività elettrica o studiarle al microscopio provoca stress meccanici [Wagenaar et al., 2006] oltre che una rapida variazione di acidità. Infatti la ridotta percentuale di anidride carbonica nell'aria ambientale (inferiore a 0.05%) innalza il pH a valori superiori al range fisiologico in meno di 30 minuti, portandolo ad un valore alcalino letale (8.5) in meno di due ore [Potter and DeMarse, 2001]. Infine, nonostante la presenza di un controllo termico nel set-up di registrazione possa permettere di mantenere la coltura su MEA a 37°C fuori dall' incubatore, questa temperatura accelera l'evaporazione del mezzo a contatto con aria non umida.

Risulta dunque ostica la registrazione dell' attività elettrofisiologica per periodi lunghi pena la sopravvivenza delle colture. Va ricordato che anche per le registrazioni brevi, le fluttuazioni di temperatura, pH e osmolarità e gli stress meccanici a cui sono sottoposti i neuroni inducono un declino graduale della vitalità cellulare [Blau et al., 2009]. Ne consegue che anche compiendo esperimenti ripetuti ma accorciando la loro durata, le fluttuazioni ambientali limitano comunque la sopravvivenza cellulare a due mesi [Potter and DeMarse, 2001]. Infine la loro influenza sull'attività delle reti diminuisce la riproducibilità dei dati raccolti [Gross and Schwalm, 1994] e ne ostacola l'interpretazione.

Gli studi più lunghi riportati in letteratura, a causa dei limiti sperimentali sopra citati, hanno permesso l'analisi dell'attività delle reti cresciute su MEA fino a 5-8 settimane *in vitro*, attraverso sessioni di registrazione brevi (inferiori a 30 minuti) e distanziate nel tempo (da una volta al giorno a una volta a settimana) [Wagenaar et al., 2006, Chiappalone et al., 2006]. Lo studio a lungo termine di reti neuronali deposte su MEA risulta tuttora una sfida della Neuroscienza.

In letteratura sono stati proposti metodi per aumentare la longevità delle colture cellulari [Potter and DeMarse 2001; Blau et al., 2009], strategie per osservare o monitorare le cellule all'interno di un incubatore [Slocum et al., 2000; Potter and DeMarse, 2001; Mukai et al., 2003] e camere ambientali autonome in grado di mantenere le cellule in ambienti controllati durante le osservazioni al microscopio e registrazioni elettriche intra-cellulari o extra-

cellulari con MEA [Blau and Ziegler, 2001; Pancrazio et al., 2003; Ho et al., 2005; Petronis et al., 2006]. Presso il laboratorio NearLab è stata sviluppata una camera con controllo ambientale in polimetilmetacrilato (PMMA) sigillata dall'esterno tramite un coperchio a tenuta, in grado di contenere una coltura neuronale su MEA e di interfacciare i microelettrodi con un sistema commerciale esterno (MCS) per permettere la registrazione dell'attività elettrofisiologica in esperimenti a lungo termine [Biffi et al, 2012]. Tale setup di registrazione non è però bastato ad assicurare un SNR (*Signal-to-Noise Ratio*) paragonabile a quello del set-up commerciale (in cui il MEA è alloggiato nelle immediate vicinanze di uno stadio di pre-amplificazione).. L'ipotesi più accreditata per spiegare tale perdita di SNR è la mancanza di un buffer nelle immediate vicinanze del MEA, cioè di uno stadio con impedenza di ingresso molto elevata e impedenza di uscita molto bassa che disaccoppi dall'elettronica a valle e quindi riduca l'attenuazione dei segnali neuronali [Bai and Wise, 2001].

L'evoluzione del primo prototipo realizzato al NearLab ha previsto di includere 4 alloggiamenti per colture neuronali, in modo da poter effettuare esperimenti in parallelo da diversi MEA, e di progettare e realizzare un'elettronica dedicata per l'amplificazione e il filtraggio dei segnali neuronali da MEA a 60 elettrodi. Tale sistema elettronico dedicato è stato suddiviso in uno primo stadio di pre-amplificazione, da integrare internamente alla camera ambientale per ovviare alla perdita di SNR, e in un secondo stadio di amplificazione e filtraggio, da porre all'esterno della camera prima del sistema di acquisizione (MCS) [Regalia et al., 2012].

Gli obiettivi di questo lavoro di tesi sono:

- 1) la validazione dello stadio di pre-amplificazione tramite test elettronici sui circuiti stampati già realizzati presso il NearLab.
- 2) la validazione dello stadio di pre-amplificazione tramite registrazioni da segnali neuronali su MEA, per valutare il miglioramento del SNR rispetto al prototipo iniziale del sistema.
- 3) la progettazione, la realizzazione e la validazione tramite test elettronici dello stadio di amplificazione e filtraggio da posizionare in cascata allo stadio di pre-amplificazione

Il lavoro è stato svolto presso il laboratorio NearLab (Neuroengineering and medical robotics Laboratory) del DEIB (dipartimento di Elettronica, Informazione e Bioingegneria) e presso il laboratorio Alembic (Advanced light & electron microscopy bio-imaging center) della fondazione San Raffaele del Monte Tabor (Milano).

# CAPITOLO 1

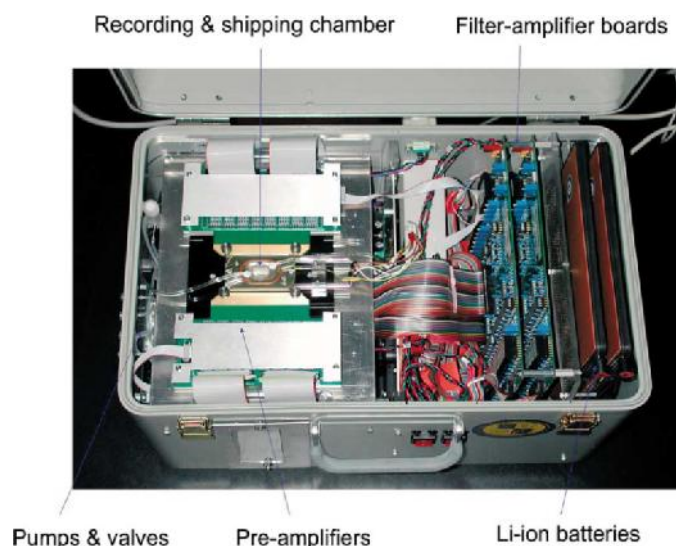
## 1.1 Sistemi custom di registrazione dell'attività elettrica mediante MEA

Lo studio dell'attività elettrica di cellule *in vitro* nel lungo periodo permetterebbe l'analisi di processi cellulari dinamici che non sarebbero altrimenti osservabili. Esempi di questi fenomeni sono la differenziazione cellulare, la variazione dei pattern di attività elettrica sia durante una normale attività fisiologica sia sotto effetto farmacologico, l'invecchiamento cellulare. In letteratura è possibile trovare realizzazioni di sistemi di registrazione che permettono anche il mantenimento delle cellule in condizioni vitali e stabili durante tutto l'arco della coltura, evitando che la sopravvivenza cellulare sia influenzata da variabilità esterne generalmente legate al set-up sperimentale adottato durante le osservazioni. Tali sistemi necessitano di una elettronica custom in grado di amplificare e filtrare il segnale elettrico proveniente dalle colture che si integri con il dispositivo o la camera per il mantenimento della vitalità delle colture. In seguito vengono riportati alcuni esempi dei suddetti sistemi.

Nel 2003 Pancrazio e collaboratori hanno presentato un dispositivo per monitorare colture neuronali che integra un sistema di controllo termico, un sistema di perfusione del mezzo di coltura ed un sistema elettronico per amplificare e filtrare i segnali da una coltura su MEA (Figura 1.1) [Pancrazio et al., 2003].

Ogni canale di registrazione è accoppiato ad uno stadio di amplificazione e filtraggio passa banda con banda passante tra i 300Hz e i 5 kHz e guadagno pari a 250 utilizzando amplificatori a basso rumore. Durante l'utilizzo dell'intero sistema con colture neuronali si sono misurati valori di input referred noise (i.e. valori di noise all'uscita di un canale quando l'ingresso è collegato a massa, riportati all'ingresso) di 4-6  $\mu\text{V rms}$  (root mean squared), tale per cui potenziali maggiori di 40 $\mu\text{V}$  sono facilmente determinabili. Pancrazio definisce la portabilità come un requisito desiderabile per il loro sistema, perchè facilita il loro trasporto sia all'interno sia all'esterno di un laboratorio e non li vincola ad una postazione fissa. Per ottenerla integra al sistema una elettronica compatta per la registrazione dei segnali

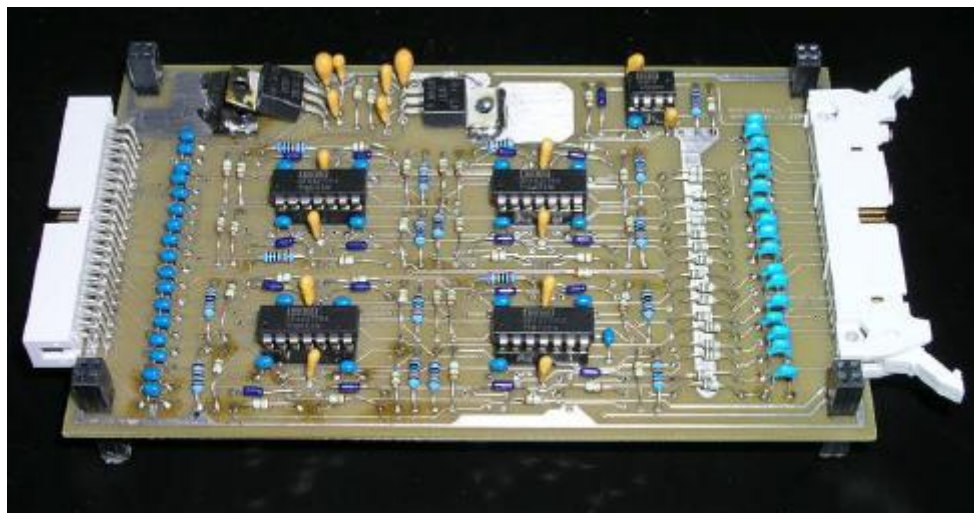
extracellulari neuronali. Tale sistema ha lo svantaggio di avere un software on-line che misura come unico parametro della vitalità cellulare lo spike rate medio, tralasciando altri parametri quali durata burst, ampiezza burst e sincronizzazione degli spike [Gross, 1994; Keefer et al., 2001].



**Figura 1.1.** Foto del sistema di registrazione di un MEA presa da [Pancrazio et al., 2003]. Si possono vedere le schede dei due stadi di pre-amplificazione e filtraggio/amplificazione.

In seguito al sistema di Pancrazio, sono stati proposti altri circuiti alternativi ad ingombranti costosi sistemi commerciali dedicati ad amplificare e filtrare segnali neuronali da matrici di microelettrodi per esperimenti *in vitro* [Obeid et al., 2004, Rolston et al., 2009]. In particolare Rolston e collaboratori hanno implementato una scheda analogica che provvede a regolare l'alimentazione a ogni stadio di registrazione e a filtrare i dati acquisiti da ogni canale attraverso un filtro attivo passa-alto (configurazione Butterworth) a 2 poli e un filtro passa-basso a 1 polo (Figura 1.2).

Tale scheda è in grado di interfacciarsi con 17 canali (di cui uno di riferimento); il sistema complessivo prevede l'utilizzo di 4 schede per poter interfacciare il sistema con 64 canali. In uscita è prevista la digitalizzazione tramite scheda di acquisizione a 16 bit. Tale sistema ha il vantaggio di permettere la stimolazione elettrica delle colture cellulare, di registrare potenziali d'azione con breve periodo di latenza e di essere modulabile per registrazioni sia *in vivo* che *in vitro*. Inoltre il software di gestione e controllo è open-source.

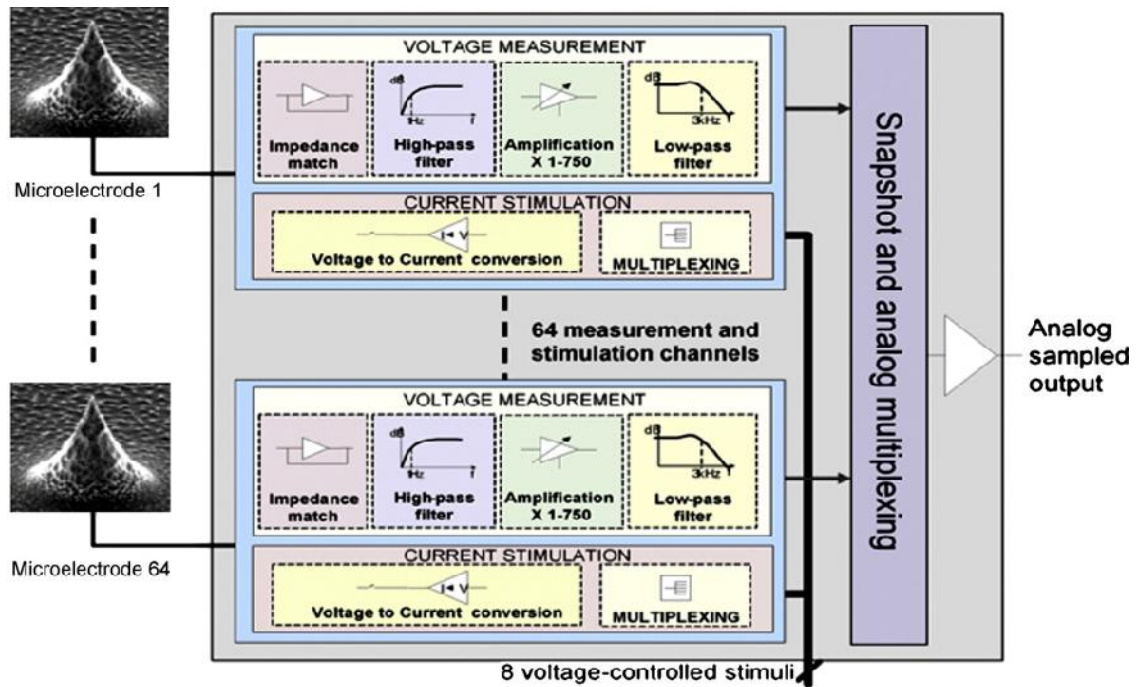


**Figura 1.2.** Foto di un circuito stampato (15.2 x 8.9 cm) con componenti discreti dedicato all'amplificazione dei segnali rilevati da 16 canali di un MEA [Rolston et al., 2009]. Impilando una sopra l'altra quattro di queste schede, gli autori hanno ottenuto un front-end compatto per 64 canali.

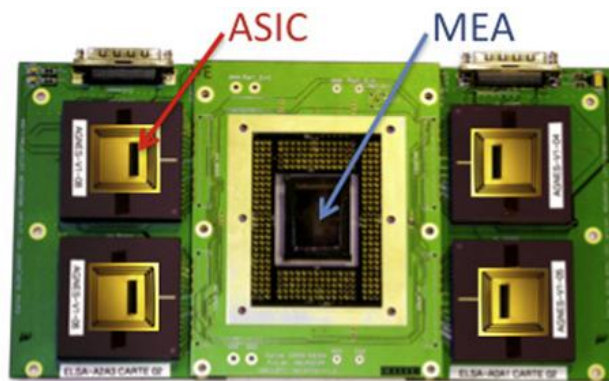
Una tecnologia che sta sempre più prendendo piede nell'ambito dello studio delle colture neuronali e, più in generale, cellulari, è quella CMOS (Complementary Metal-Oxide Semiconductor) in grado di garantire un array di elettrodi ad alta densità [Charvet et al., 2010; Frey et al., 2007].

Charvet e collaboratori hanno sviluppato un sistema custom di registrazione e stimolazione MEA a 64 canali tramite implementazione di un ASIC (Application Specific Integrated Circuit) ovvero un circuito integrato creato appositamente per risolvere un'applicazione di calcolo ben precisa (specific purpose) [Charvet et al., 2010]. Questo circuito prevede sia l'amplificazione che la stimolazione di tutti e 64 i canali che costituiscono il MEA. Ogni canale prevede un'amplificazione costituita da 4 stadi: un adattatore di impedenza, un filtro passa alto, un amplificatore a basso rumore con guadagno variabile e un filtro passa basso (Figura 1.3). Il pre-amplificatore e l'amplificatore provvedono insieme a un guadagno in continua di 75 e di 10, rispettivamente, nella banda 1Hz – 3 kHz. Sia il pre-amplificatore che l'amplificatore possono essere impostati per ottenere guadagni di 1, 10, 75 e 750.

Il sistema di controllo elettronico è in grado di interfacciarsi fino a 4 schede ASIC in parallelo in modo da permettere lo studio fino a 256 canali (Figura 1.4).



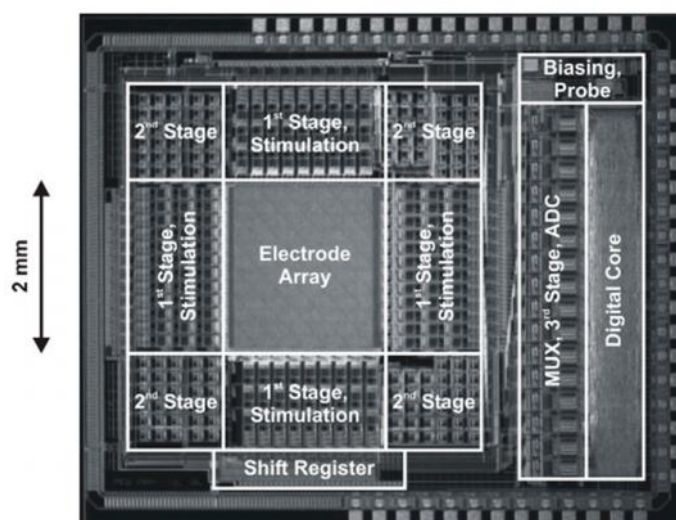
**Figura 1.3.** Descrizione di una scheda ASIC a 64-canali [Charvet et al., 2010]. Il circuito integrato è organizzato linearmente in modo da permettere sia l'amplificazione che la stimolazione. Ogni linea di amplificazione include 4 stadi :unadattore di impedenza, un filtro passa-alto, un amplificatore a basso rumore con guadagno variabile e un filtro passa basso.



**Figura 1.4.** Foto dell'intero sistema a 256-canali [Charvet et al., 2010].

Frei e collaboratori hanno realizzato un sistema con array di oltre 11000 elettrodi e lo stadio di filtraggio e amplificazione sullo stesso chip (Figura 1.5).





**Figura 1.5.** Micrografia del chip.

Il segnale in uscita dagli elettrodi viene condizionato da 126 canali di lettura che, tramite guadagno programmabile, sono in grado di amplificare il segnale di un fattore variabile tra 1 e 10000 in 18 passi. Il filtraggio viene invece eseguito da un filtro passa-alto di primo ordine con frequenza di taglio pari a 0.3 Hz e da un filtro di secondo ordine passa-basso con frequenza di taglio programmabile tra i 4 KHz e i 14 KHz. I segnali vengono dunque campionati a 20 kHz e digitalizzati usando un A/D converter (ADC) a 8-bit. La dimensione totale dell'array è di 11016 in  $2 \times 1.7 \text{ mm}^2$ . Come detto, però, solo un sottogruppo di 126 elettrodi viene registrato contemporaneamente in quanto, per minimizzare il rumore, il front-end è stato posizionato esterno all'array di elettrodi. Il sottogruppo è selezionabile di volta in volta dall'operatore. Una PCB custom è stata realizzata per realizzare un sistema di acquisizione in grado di interfacciarsi con 5 neurochips che dunque possono lavorare simultaneamente. Tale sistema è stato utilizzato per la registrazione di neuroni ippocampali di ratto per una durata di 16 giorni. L'alta densità spaziale ha permesso di individuare il segnale di singoli neuroni da tre diversi elettrodi riconoscendo le loro forme di segnale caratteristiche attraverso STA (Spike Triggered Averaging).

Dunque, per utilizzi che necessitano una risoluzione pari alla singola cellula, la tecnologia CMOS sembra essere la migliore soluzione possibile. Nonostante la tecnologia CMOS sia oggi ampiamente utilizzata, i passaggi di post-produzione fanno dei CMOS MEAs una tecnologia proprietaria, ovvero difficilmente realizzabile nei laboratori non avanzati, e costosa data la richiesta di una speciale facility di produzione microelettronica e di una maschera litografica che impattano fortemente sul costo finale [Lyakhov et al.,2006].



Il tipo di filtro utilizzato nei front-end varia a seconda delle ottimizzazioni a cui, in fase di progettazione, si è più interessati. Ad esempio scegliere di realizzare un filtro in modalità Butterworth piuttosto che Bessel significa privilegiare una banda passante il più possibile piatta anzichè volere un ritardo il più possibile costante delle componenti in banda passante e, di conseguenza, una minore distorsione della forma d'onda del segnale. Obeid e collaboratori hanno realizzato un front-end per il filtraggio e l'amplificazione di 16 canali costituito esclusivamente da filtri Bessel. Il front-end analogico è costituito da 16 canali, ognuno dei quali è costituito da 4 stadi, identici per ogni canale: pre-amplificazione, amplificazione differenziale, filtraggio e amplificazione a guadagno variabile [Obeid et al., 2003]. (Figura 1.6). Il guadagno totale può variare tra 3200 (70 dB) e 50000 (94 dB) con una banda passante compresa tra i 350 Hz e gli 8 kHz. La distorsione della forma d'onda è minimizzata proprio dalla configurazione Bessel. Ciò preserva la fedeltà del segnale, necessaria se il meccanismo di identificazione degli spike si basa sulla forma d'onda.

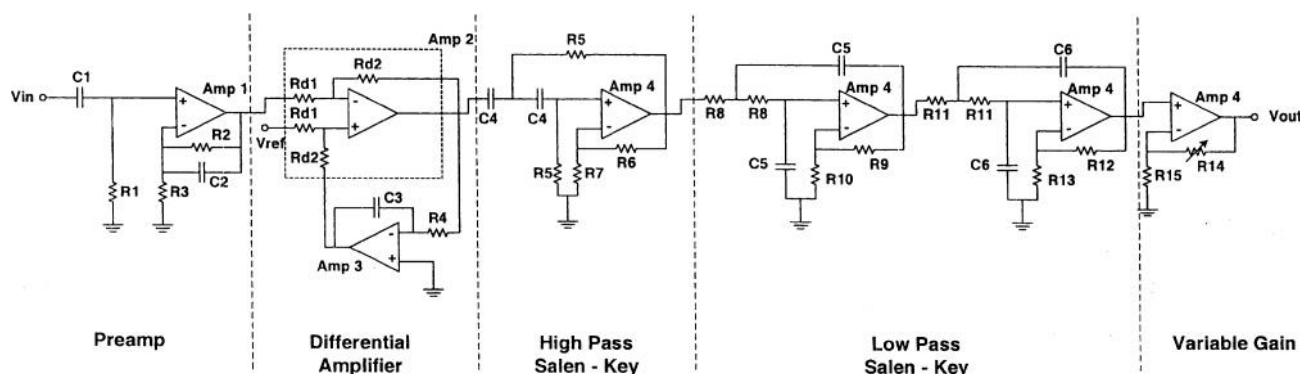


Figura 1.6. Schema del front-end [Obeid et al., 2004].

Un altro gruppo ha invece scelto l'utilizzo di un INA (Instrumentation Amplifier) al primo stadio di un front-end a 16 canali utilizzato per amplificare segnali neuronali provenienti da MEA a 60 canali (Figura 1.7) (Liang et al., 2004).

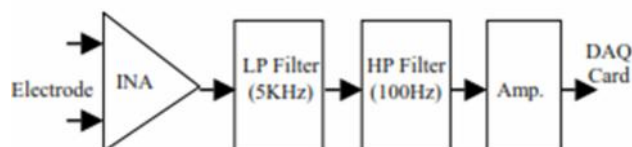


Figura 1.7. Diagramma a blocchi del front-end realizzato da [Liang et al., 2004].

Tale sistema è inoltre in grado di misurare l'impedenza degli elettrodi, parametro utile per studiare la vitalità e l'adesione cellulare. La banda di interesse è stata definita tra i 100 Hz e i 5 kHz. Lo stadio finale prevede un guadagno programmabile tale per cui il guadagno totale del front-end può essere scelto tra 800 e 4500. Inoltre è stata creata un interfaccia grafica in Labview per poter gestire e analizzare i segnali registrati.

Non sempre però vengono registrati tutti i canali dei MEA ma, tramite circuiti logici, si decide di registrare, a intervalli alternati, diverse Regioni di Interesse (ROI) che messe assieme caratterizzano la totalità della coltura [Muller et al., 2011]. Tale sistema ha previsto l'utilizzo di un amplificatore caratterizzato da un rumore molto basso (figura 1.8). Come si può vedere dallo schematico, l'amplificatore a basso rumore consiste in un amplificatore principale con un circuito buffer di retroazione resistivo. Esso è caratterizzato da un architettura folded-cascode (architettura che, comparata a quella ordinaria degli amplificatori operazionali, permette un alto guadagno lasciando un margine di fase alto e stabile) includente la compensazione di offset in grado di compensare il disaccoppiamento nel circuito. L'architettura folded-cascode è stata scelta per il suo alto guadagno ad anello aperto, il PSRR (Power Supply Rejection Ratio) e il CMRR (Common Mode Rejection Ratio) elevati e la possibilità di implementare una correzione di input referred offset in un range tra i -55 mV e i +9mV. In accordo alle simulazioni, l'amplificatore ha esibito un guadagno di 84 dB, un prodotto guadagno-banda (GBWP) di circa 13.5 MHz e un margine di fase di circa 72°. La densità spettrale di potenza (PSD) di rumore termico raggiunge i valori di  $19 \text{ } \mu\text{V}/\sqrt{\text{Hz}}$ .

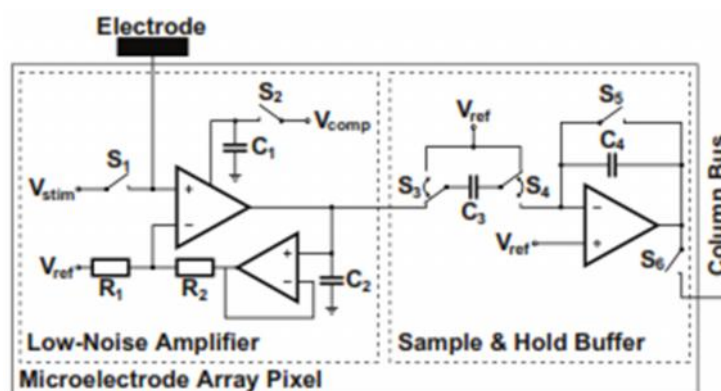


Figura 1.8. Diagramma a blocchi del circuito di amplificazione [Muller et al., 2011].

Il guadagno finale del blocco di amplificazione è impostato dal rapporto  $R_2/R_1$ . Il contributo di queste resistenza al rumore impedisce un alto valore di  $R_1$ . Questo, d'altra parte, implica un significativo flusso di corrente in uscita dall'amplificatore verso il circuito resistivo riducendo di molto le prestazioni dell'amplificatore. Di conseguenza un circuito buffer è stato inserito nella retroazione.

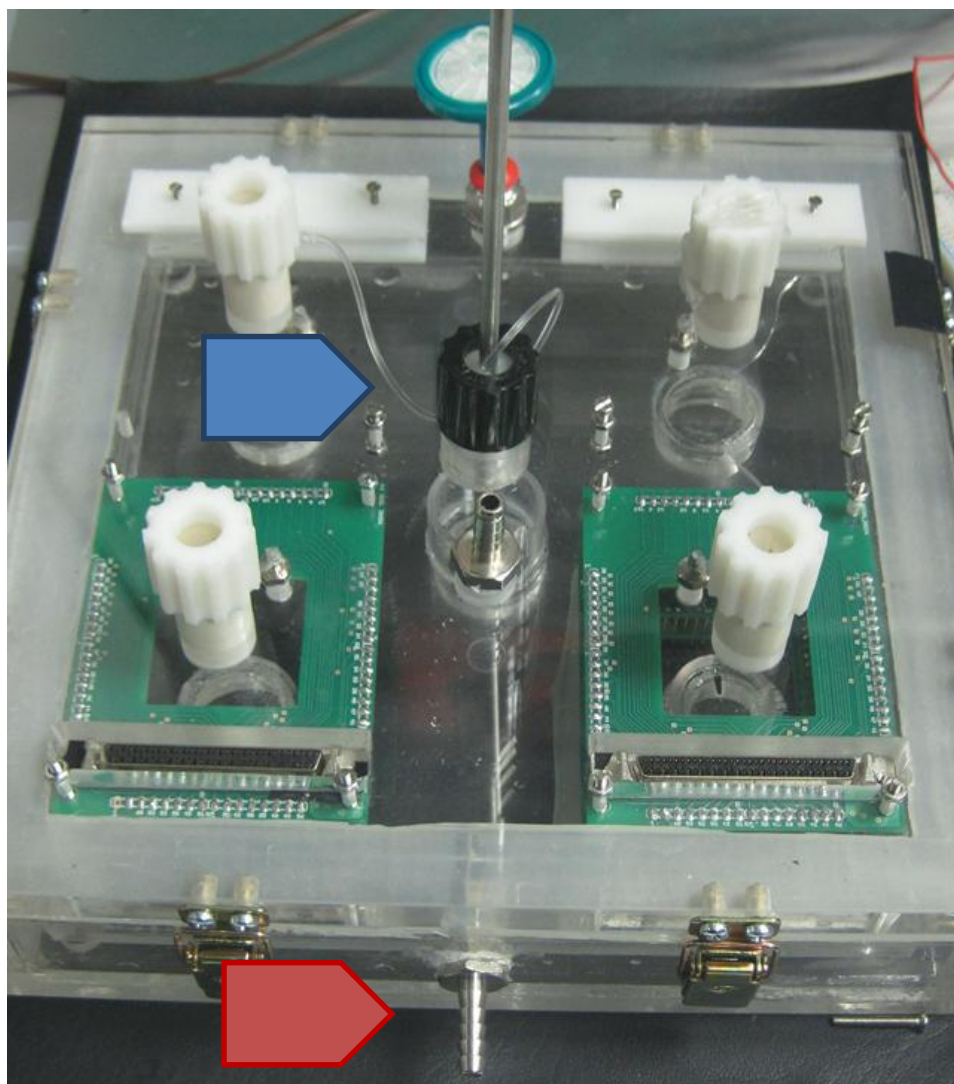
## **1.2 Descrizione del set-up sviluppato al NearLab**

Dalla letteratura si evince che non sono presenti sistemi in grado di preservare colture per lunghi periodi di tempo e allo stesso modo registrarne l'attività elettrofisiologica. Presso il laboratorio NearLab è stata sviluppata una camera ambientale in polimetilmetacrilato sigillata dall'esterno tramite un coperchio a tenuta. In tale camera è stato progettato un sistema di controllo ambientale per la temperatura, l'umidità di atmosfera, il pH del terreno di coltura e la sterilità. Inoltre la progettazione della camera ha tenuto conto della trasparenza ottica (necessaria per il monitoraggio con microscopio invertito), della possibilità di accedere alla camera di incubazione dall'esterno per effettuare il ricambio del terreno di coltura e stimolazioni farmacologiche e, infine, dell'integrazione di una scheda elettronica dedicata per l'acquisizione dei segnali neuronali provenienti dai 60 microelettrodi del MEA alloggiato nella camera [Biffi et al, 2012]. Nel primo prototipo di questa camera, l'elettronica integrata era una semplice connettiva per collegare l'uscita degli elettrodi al sistema di filtraggio ed acquisizione esterno (MCS), tramite dei pin in oro a pressione disposti verticalmente sopra i contatti del MEA ed un foro nel coperchio per portare i segnali all'esterno tramite opportuno connettore (cavo MCS) .

Problemi di basso SNR, dovuti alla assenza di uno stadio di pre-amplificazione vicino alla sorgente di segnale, hanno imposto la realizzazione di una scheda di pre-amplificazione a 60 canali interna alla camera. Inoltre, la camera stessa è stata modificata per permettere l'alloggiamento di 4 MEA, con l'idea di realizzare un front-end modulare, connettendo ciascun MEA alla sua scheda di pre-amplificazione. La foto in Figura 1.9 mostra il prototipo attuale della camera di incubazione a 4 MEA. Nella foto, in due delle quattro postazioni per le colture sono montate le PCB di pre-amplificazione a 60 canali.

Lo stadio di pre-amplificazione è stato progettato per amplificare il più possibile il segnale proveniente da ogni micro-elettrodo, in modo da poter ritenere trascurabile il rumore

introdotto dagli stadi successivi, ottimizzando quindi le prestazioni di tutto il circuito in termini di rumore [Bai and Wise, 2001, Dabrowski et al, 2004, Obeid et al., 2004]. Inoltre, la topologia dello stadio è stata scelta privilegiando il requisito di minimizzazione dell'area occupata (e quindi del numero di componenti passivi). Il circuito di pre-amplificazione definito è composto da un Opamp (amplificatore operazionale) in configurazione passa alto non invertente con guadagno di circa 40 dB e frequenza di taglio pari a 300 Hz, alimentato a  $\pm 7$  V (figura 1.10).



**Figura 1.9.** Fotografia della camera di incubazione a 4 MEA, in cui sono visibili due schede di pre-amplificazione a 60 canali interne alla camera. Attraverso i fori rettangolari del coperchio, posti sopra le connettive delle PCB, il segnale viene collegato al cavo MCS. La freccia blu indica la sonda per il controllo della temperatura. La freccia rossa indica il foro attraverso cui viene convogliata acqua riscaldata per mantenere a temperatura fisiologica le colture.

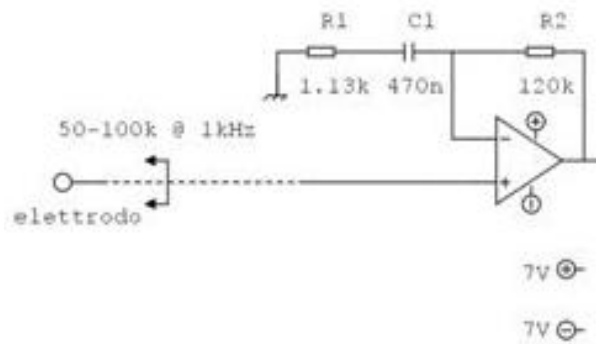


Figura 1.10. Schematico del circuito di pre-amplificazione.

L'utilizzo di un pre-amplificatore in configurazione non invertente ha il vantaggio di presentare un'impedenza di ingresso elevata e un'impedenza di uscita molto bassa, disaccoppiando la sorgente ad alta impedenza (i microelettrodi dei MEA hanno un'impedenza tipica di 50-100 k a 1 kHz) dall'elettronica a valle e quindi evitando l'attenuazione del segnale [Borghini et al., 2007]. La funzione di trasferimento dello stadio contiene un polo e uno zero e la sua forma analitica è data da:

$$G(s) = \frac{1 + sC_1(R_1 + R_2)}{1 + sC_1R_1}$$

con frequenza dello zero e del polo pari a:

$$f_z = \frac{1}{2\pi C_1(R_1 + R_2)}$$

$$f_p = \frac{1}{2\pi C_1R_1}$$

Il guadagno risultante è pari a 40 dB dopo 300 Hz e a 0 dB fino a circa 3 Hz.

#### Scelta degli amplificatori operazionali

Per l'implementazione del circuito di pre-amplificazione è stato scelto l'OP4177 (Analog Devices, Massachusetts, USA) caratterizzato da:

- Basso rumore pari a circa 800 nV da 1 kHz a 10 kHz ( $8 \text{ nV}/\sqrt{\text{Hz}}$ )
- Bassa corrente di alimentazione: 400  $\mu\text{A}$  per amplificatore
- CMRR (*common-mode rejection ratio*) minimo di 120 dB

- Bassa tensione di offset ( $\pm 60 \mu\text{V}$ , valore tipico)
- Bassa corrente di bias ( $2 \text{ nA}$ , valore massimo)
- Alimentazione duale (da  $\pm 3 \text{ V}$  a  $\pm 12 \text{ V}$ )
- prodotto guadagno banda (*gain bandwidth product*, GBWP) pari a 1.3 MHz

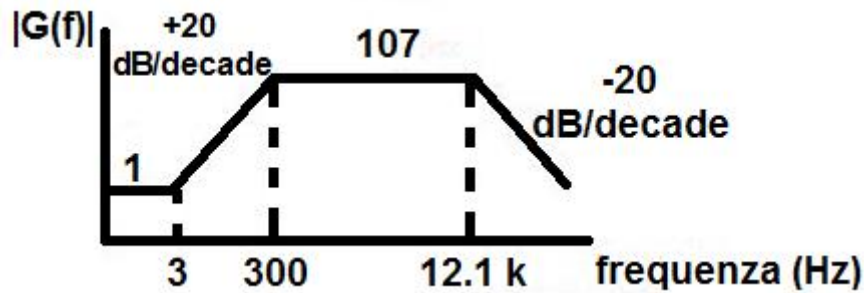
Gli Opamp introducono un errore di offset e correnti di bias che risultano critici se l'amplificatore ha un guadagno non nullo in DC, come nel caso in esame. Per

questo, si è scelto, oltre ad un offset basso degli Opamp, anche una corrente di bias dell'ordine dei pA, soprattutto considerando che il percorso conduttivo verso massa al morsetto non invertente del primo Opamp può essere molto elevato (superiore a  $10 \text{ M}\Omega$  nel caso di cellule sopra i microelettrodi) [Wrobel et al., 2006].

L'alimentazione duale dell'OP4177 (da  $\pm 3$  a  $\pm 12 \text{ V}$ ) è necessaria per la natura bipolare dei segnali neuronali. Il range utilizzato per gli Opamp ( $\pm 7 \text{ V}$ ) è stato ritenuto sufficiente per evitare saturazione degli stadi. Infatti, con un tipico segnale neuronale in ingresso al circuito, ampio  $300 \mu\text{V pp}$  (picco picco), l'uscita avrà un'ampiezza picco-picco di circa  $290 \text{ mV}$ , ben inferiore al range di alimentazione anche considerando l'offset in uscita dovuto al circuito. Con tale alimentazione, considerando il guadagno unitario del primo stadio per le basse frequenze, la tolleranza per gli offset in ingresso coincide con  $\pm 2.5 \text{ V}$ . Il Prodotto Guadagno Banda (GBWP) è la frequenza dopo la quale il guadagno dell' Opamp, in configurazione ad anello aperto, non è più costante ma inizia a decadere. Considerando la costanza di questo parametro, un GBWP pari a 1.3 MHz permette al pre-amplificatore di amplificare fino a 12.1 KHz senza tagliare la banda di interesse dei segnali. Infatti:

$$f_c = \frac{GBWP}{107} = 12.1 \text{ kHz}$$

La banda passante del circuito di pre-amplificazione risulta dunque compresa tra i 300 Hz e i 12.1 kHz (Figura 1.11).



**Figura 1.11.** Schematico del circuito di pre-amplificazione per il singolo canale del MEA e relativo diagramma di Bode approssimato del modulo.

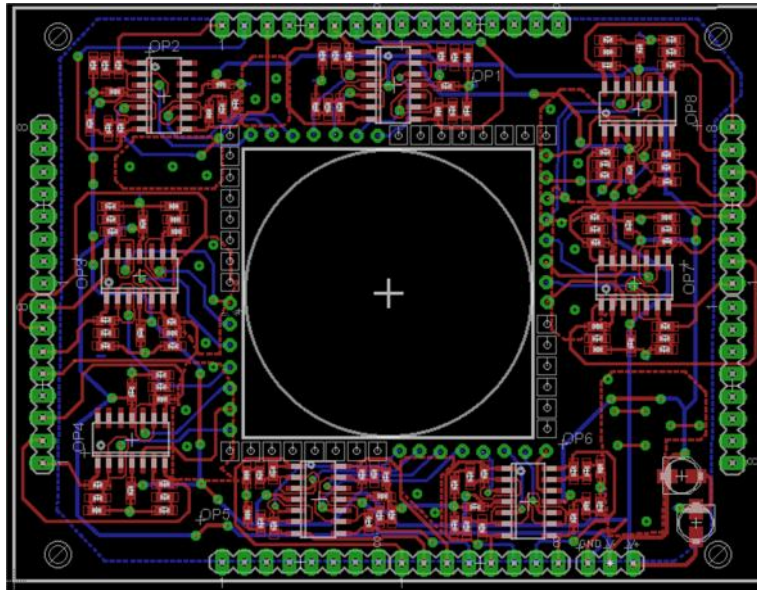
Lo stadio di pre-amplificazione è stato inoltre simulato con Spice, per valutare la risposta in frequenza prima della realizzazione fisica delle PCB.

Lo stadio di pre-amplificazione è stato implementato su due PCB da 30 canali ciascuna, da posizionare una al di sopra dell'altra. La Figura 1.12 riporta il disegno di una delle schede effettuato tramite il software Eagle e la Figura 1.13 rappresenta una fotografia della PCB realizzata e assemblata. Da queste PCB, tramite connettiva, il segnale viene poi incanalato in un cavo (MCS) la cui uscita permette di interfacciarsi con un secondo stadio di amplificazione e filtraggio.

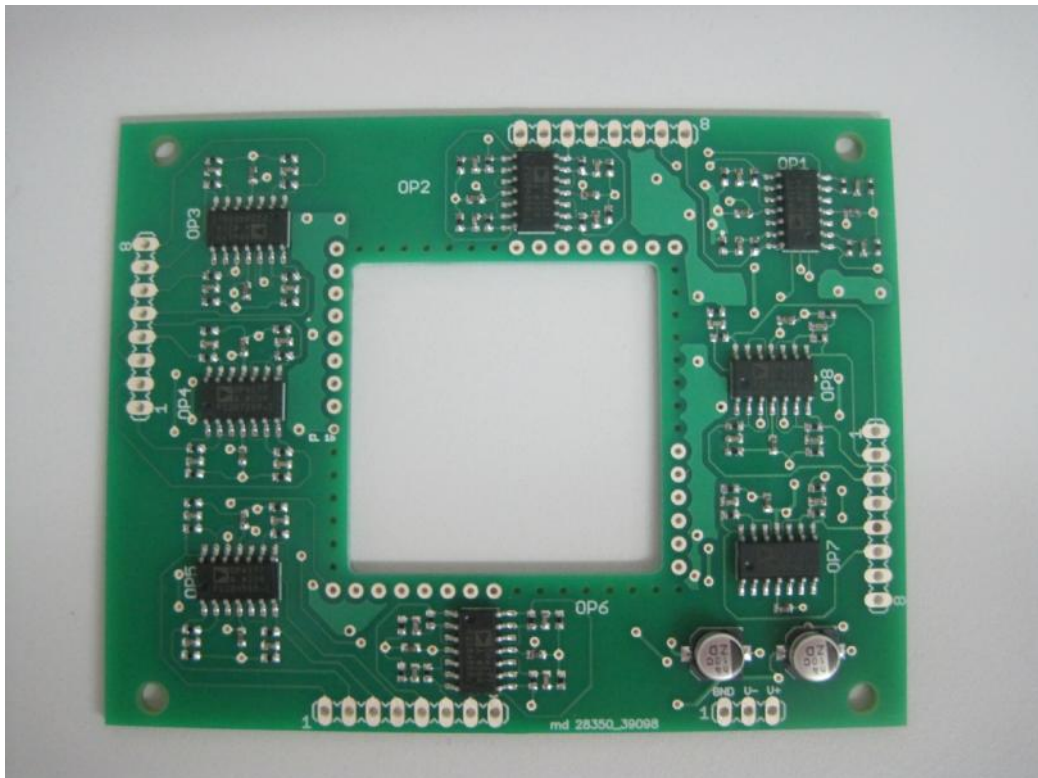
Lo stadio di pre-amplificazione custom interno alla camera di incubazione si interfaccia, nel prototipo attuale, con un filtro amplificatore commerciale con una banda passante compresa tra i 300 Hz e i 3 kHz ed un guadagno pari a 20 (FA64S - MCS).

Il segnale in uscita da FA64 viene campionato da una scheda di acquisizione (16 bit, fino a 50 kHz, USBME64, MCS), che si interfaccia tramite porta USB direttamente con un computer. Tramite il software commerciale MCRack (MCS) ed algoritmi custom implementati in Matlab (The Mathworks) vengono usualmente effettuate le analisi dei segnali da MEA.





**Figura 1.12.** Layout di una delle due schede di pre-amplificazione. Il foro quadrato in mezzo è allineato con il MEA, in modo da preservare la visibilità dall'alto. Ai bordi interni vi sono i pin che si contattano i pad degli elettrodi del MEA; i segnali vengono quindi amplificati e registrati dagli amplificatori operazionali e mandati nelle connettive posizionate alle estremità della PCB.



**Figura 1.13.** Foto della PCB interna una volta realizzata ed assemblata.



## ***CAPITOLO 2***

### **2.1 Protocollo sperimentale**

In questo lavoro di tesi, la scheda di pre-amplificazione progettata al Nearlab (come descritto nel capitolo 1) è stata validata eseguendo i test di alimentazione, offset, input-referred noise, DC input, risposta in frequenza e cross talk. I risultati estratti sono quindi stati analizzati con Matlab per ottenere le specifiche tecniche delle PCB. I primi test elettronici sono stati eseguiti per tutti i canali costituenti le due schede interne di pre-amplificazione da 30 canali ciascuna (che nel seguito verranno chiamate PCB1 e PCB2). Successivamente, identiche prove sono state effettuate su repliche di tali schede, realizzate con l'obbiettivo di acquisire segnali da due MEA in parallelo. I test sono stati eseguiti su schede alimentate a +7 V e -7 V tramite alimentatore da banco (GPS-4303, Instek).

#### **Test di alimentazione**

La schedina viene alimentata da due batterie da 7 volt collegate in serie e viene verificata, tramite multimetro impostato in modalità di lettura in DC, il valore di alimentazione (sia positiva sia negativa) a livello dei piedini di ciascun amplificatore operazionale. Dai valori del data sheet risulterebbe inoltre una corrente massima di alimentazione per singolo amplificatore pari a 19.2 mA.

#### **Test dell'offset**

Viene messo l'ingresso di un canale a massa collegandolo con un filetto al punto più vicino del piano di massa e viene misurata l'uscita del canale con un multimetro impostato in modalità di lettura in DC.

#### **Test risposta in frequenza**

Viene collegato all'ingresso di un canale un generatore di funzioni (GFG-8210, Instek) e viene inviato un segnale sinusoidale senza offset con ampiezza di 100  $\mu$ V, frequenza

variabile tra i 300 Hz e i 3 KHz (banda degli spike neuronali ) e ampiezza di 1 mV per le frequenze minori di 300 Hz e maggiori di 3 kHz (fino a 10 kHz).

Per memorizzare l'ingresso e l'uscita del circuito ai fini della quantificazione del modulo della risposta in frequenza, i segnali sono stati acquisiti con frequenza di campionamento pari a 24 kHz con una scheda di acquisizione dotata di comunicazione USB con un PC (NI USB-6009, National Instruments; 14 bit; frequenza di campionamento massima: 48 kHz; range massimo di tensione in ingresso:  $\pm 10$  V, Figura 2.1) e col software NI LabVIEW (National Instruments). La durata di ogni acquisizione è stata stabilita in modo da contenere un numero di periodi pari a 100. Tramite un codice Matlab (precedentemente implementato presso il NearLab) viene calcolato il guadagno alle varie frequenze. Il calcolo prevede la sottrazione delle medie dai segnali di ingresso e uscita onde eliminare segnali in continua, zero padding dei due segnali per migliorare la risoluzione spettrale e calcolo delle rispettive trasformate di Fourier tramite algoritmo Fast Fourier Transform. Dopo aver individuato il massimo del modulo dello spettro dell'uscita in una finestra centrata intorno alla frequenza della sinusoide in ingresso, l'algoritmo calcola il guadagno come il rapporto tra il massimo dell'uscita ed il valore dello spettro di ingresso alla stessa frequenza.



**Figura 2.1.** Scheda di acquisizione NI USB-6009 a 8 input analogici (14-bit, 48 kS/s)

### **Test Output-Referred Noise**

Consiste nel mettere l'ingresso di un canale a massa collegandolo con un filetto al punto più vicino del piano di massa e misurare l'uscita con la scheda di acquisizione USB-6009

con frequenza di campionamento pari a 48 kHz. Dal segnale registrato viene calcolata la PSD (Power Spectral Density) tramite metodo di Welch e finestrazione di Hanning con sovrapposizione (overlap) fra finestre adiacenti del 50%.

Il segnale viene poi scomposto in diverse bande di frequenza tra cui quella di interesse per la detezione di spike, ovvero 300 Hz – 3 kHz. Per ogni banda è stato sottratto il noise della scheda di acquisizione USB6009, lavorando in termini di rumore RMS, per eliminare il contributo dovuto al rumore della scheda. L'Input Referred Noise in banda 300 Hz – 3 kHz viene invece trovato dividendo l'Output Referred Noise per il guadagno medio misurato in tale banda, ricavato dai test sulla risposta in frequenza. Infine vengono confrontate le misure acquisite con quelle simulate tramite Spice.

### **Test DC input**

Collegato l'ingresso di un canale a un segnale in DC (ampio 18 mV, ottenuto da una batteria accoppiata ad un partitore di tensione su bread-board) viene misurata l'uscita tramite multimetro impostato in modalità di lettura in DC e confrontata con l'uscita ideale (ovvero 18 mV, dato il guadagno pari a 1 in continua).

### **Test Cross-Talk**

Viene collegato a massa l'ingresso di un canale collegandolo con un filetto al punto più vicino del piano di massa. Tramite generatore di funzioni viene mandata una sinusoide (ampia 100  $\mu$ V e con frequenza pari a 1 kHz), all'interno della banda degli spike in un canale adiacente. Poi viene misurata l'uscita del canale con ingresso a massa per vedere quanto sia influenzata dalla sinusoide nel canale adiacente. Per quantificare il cross-talk, viene calcolato il guadagno tra l'uscita del canale con ingresso a massa e l'ingresso sinusoidale al canale adiacente. Il segnale viene poi scomposto in diverse bande di frequenza tra cui quella di interesse per la detezione di spike, ovvero 300 Hz – 3 kHz. Per ogni banda viene poi sottratto il noise della scheda di acquisizione USB6009, lavorando in termini di rumore RMS. L'Input Referred Noise in banda 300 Hz – 3 kHz viene invece trovato dividendo l'Output Referred Noise per il guadagno medio misurato in tale banda, ricavato dai test sulla risposta in frequenza. Infine vengono confrontati i valori con quelli dell'Input-referred noise dovuto al circuito [Gray 2001].

## 2.2 Risultati

### Test di alimentazione

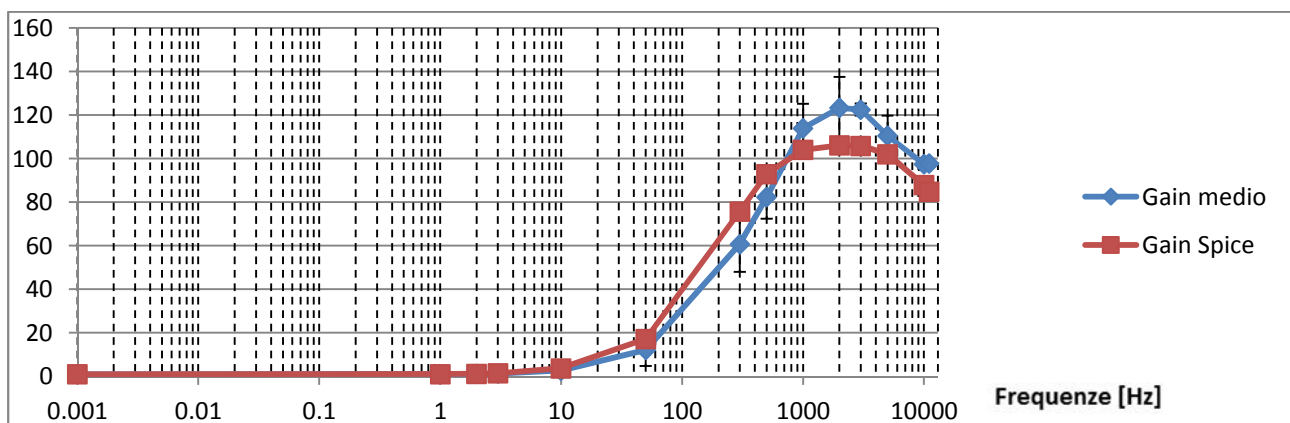
L'alimentazione ai capi degli amplificatori rispecchia quella misurata all'uscita dell'alimentatore da banco, per tutti gli amplificatori presenti in PCB1, PCB2 e nelle loro repliche. Riguardo alla corrente assorbita dalle linee di alimentazione, è stata misurata una corrente di quasi 30 mA (sia dalla linea positiva sia da quella negativa), paragonabile a quello predetto tramite il dato di corrente di quiescenza degli Opamp avendo trascurato il calcolo della potenza dissipata dai componenti passivi.

### Test dell'offset

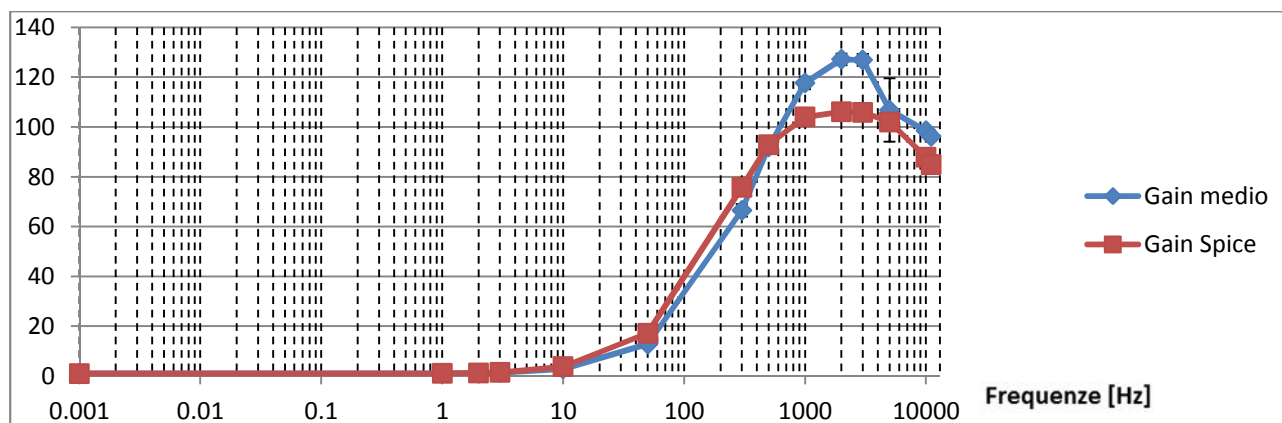
L'offset misurato in uscita è risultato minore di 1 mV per tutti i canali e per entrambe le coppie di PCB interne.

### Test risposta in frequenza

Le Figure 2.2 e 2.3 riportano il modulo della risposta in frequenza ottenuta dalle misure, a confronto con quello simulato con Spice. Il guadagno medio misurato in banda (300 Hz – 3 kHz) è risultato pari a 100.52 (40.04 dB) per la PCB1 e 106.03 (40.51 dB) per la PCB2. I dati relativi alle repliche di tali PCB risultano paragonabili : 99.44 (39.95 dB) per la replica della PCB1 e 104.37 (40.37 dB) per quella della PCB2.



**Figura 2.2.** Diagramma di Bode misurato e simulato del guadagno della PCB1. I dati del guadagno reale sono riportati come media +/- deviazione standard su 30 canali.



**Figura 2.3.** Diagramma di Bode misurato e simulato del guadagno della PCB2. I dati del guadagno reale sono riportati come media +/- deviazione standard su 30 canali.

La differenza in banda tra guadagno medio misurato e guadagno simulato è risultato del 3.72 % per la PCB1 e del 9.4 % per la PCB2. Riguardo alle repliche invece è risultato del 2.6 % per la PCB1 e del 7.7 % per la PCB2

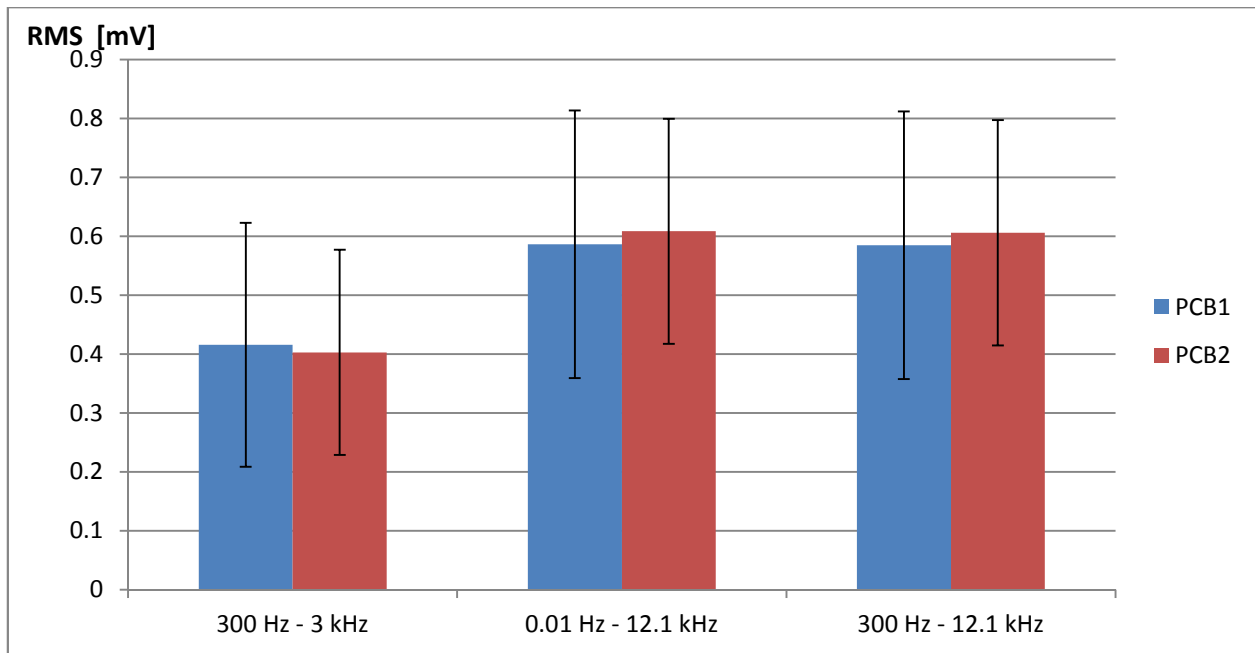
### Test Input e Output-Referred Noise

Il segnale in uscita ha presentato un valore medio picco-picco di 7.06 mV con deviazione standard di 0.83 mV RMS per la PCB1; riguardo la PCB2 invece 8.06 mV picco-picco con deviazione standard di 0.80 mV RMS. (Tabella 2.0, Figura 2.4).

L'Input-Referred Noise in banda 300Hz - 3kHz stimato per la PCB1 risulta 0.004 mV con deviazione standard di 0.004 mV. Per la PCB2 invece risulta di 0.003 mV con deviazione standard pari a 0.002 mV. Il valore simulato è risultato pari a 0.005 mV (Figura 2.5).

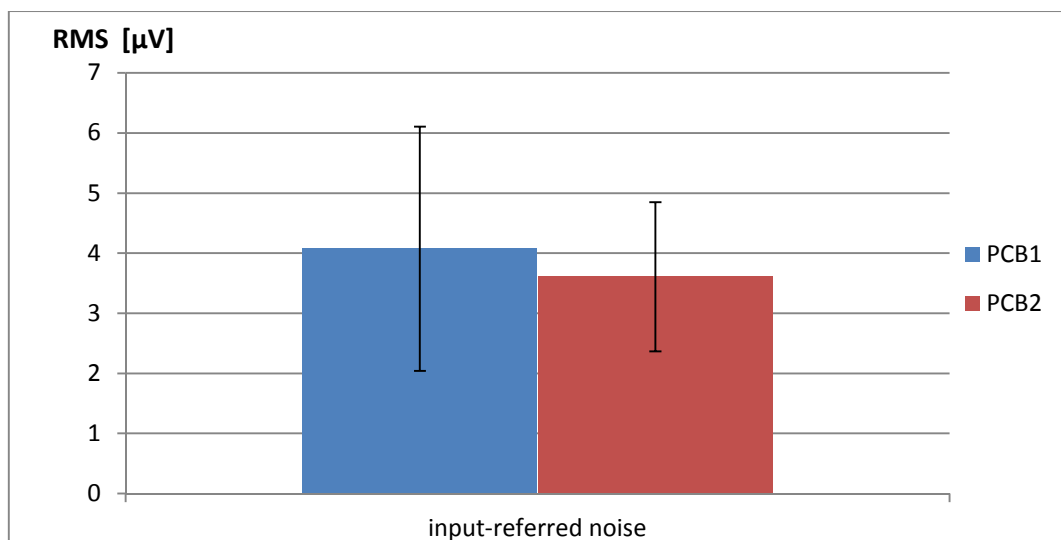
	300 Hz – 3 kHz	0.01Hz – 12.1 kHz	300 Hz – 12.1 kHz
<b>PCB1</b>	0.41 mV (0.41 mV)	0.58 mV (0.45 mV)	0.58 mV (0.45 mV)
<b>PCB2</b>	0.40 mV (0.34 mV)	0.60 mV (0.38 mV)	0.60 mV (0.38 mV)
<b>Simulazione</b>	0.51 mV	1 mV	0.98 mV

**Tabella 2.0.** Risultati del test di Output-Referred Noise e delle simulazioni eseguite con Spice. Sono indicate prima le medie e poi, in parentesi, le deviazioni standard.



**Figura 2.4.** Risultati del test di Output-Referred Noise (mV). I dati sono riportati come media +/- deviazione standard su 30 canali.

I valori delle PCB gemelle sono risultati paragonabili (differenze inferiori al 7 % nelle bande selezionate).



**Figura 2.5 :** Risultati dei test di Input-referred Noise. I dati sono riportati come media +/- deviazione standard su 30 canali.

## Test DC input

Il guadagno in continua è sempre risultato 1 con errore medio minore del 5 %.

## Test Cross-Talk

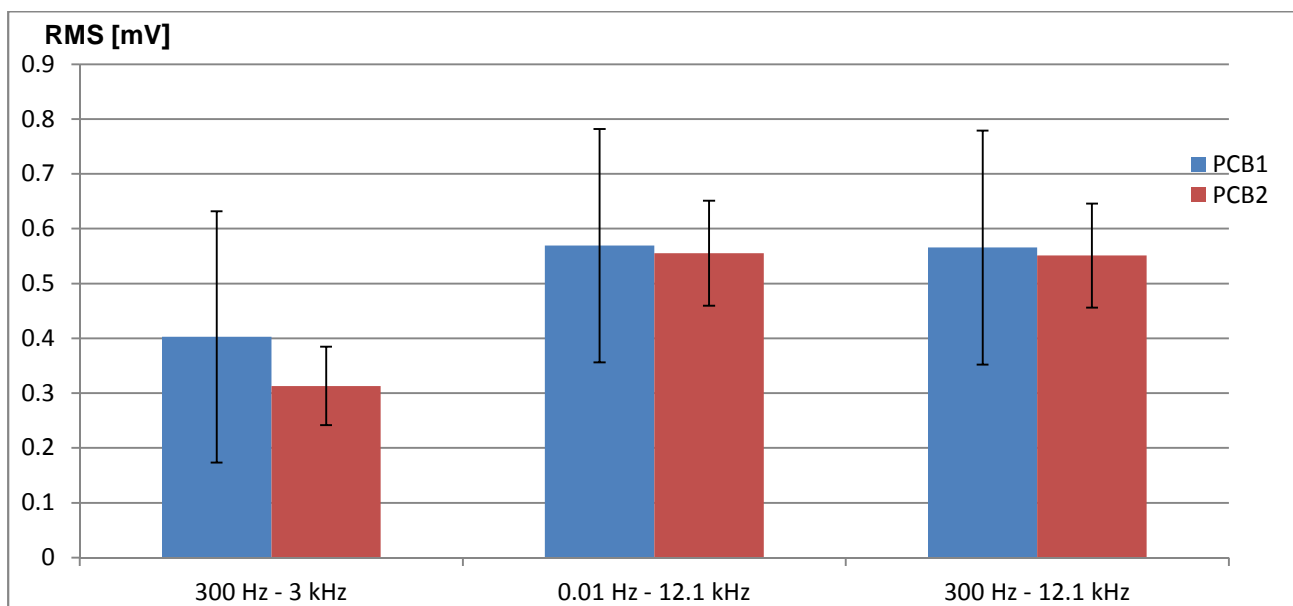
L'Output Referred Noise del test del Cross Talk ha presentato un valore picco-picco pari a 5.08 mV per la PCB1 e di 7.20 mV per la PCB2 (Tabella 2.1, Figura 2.6).

	300 Hz – 3 kHz	0.01Hz – 12.1 kHz	300 Hz – 12.1 kHz
PCB1	0.40 mV (0.45 mV),	0.56 mV (0.42 mV)	0.56 mV (0.43 mV)
PCB2	0.31 mV (0.14 mV)	0.55 mV (0.19 mV)	0.55 mV (0.18 mV)

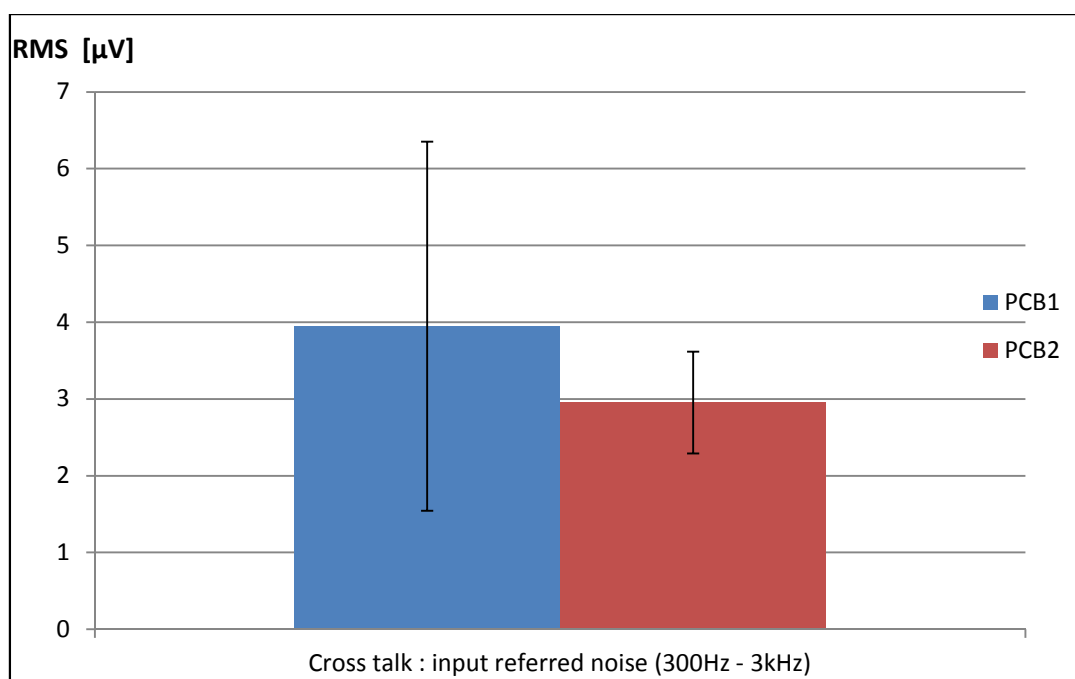
**Tabella 2.1.** Valori misurati dell' Output Referred Noise del test di Cross Talk. Sono indicate prima le medie e poi, in parentesi, le deviazioni standard.

L' Input Referred Noise in banda 300Hz - 3kHz stimato per la PCB1 risulta in media pari a 0.003 mV con deviazione standard di 0.004 mV. Per la PCB2 invece risulta di 0.003 mV con deviazione standard pari a 0.001 mV (Figura 2.7).

Il guadagno di cross-talk, misurato con un input di 100  $\mu$ V a 1 kHz, in media è risultato di 0.001 ( -60 dB) per la PCB1 e di 0.002 ( - 54 dB) per la PCB2.



**Figura 2.6.** Risultati del test di Cross-talk in termini di Output referred noise (mV). I dati sono riportati come media +/- deviazione standard su 30 canali.



**Figura 2.7.** Risultati del test di Cross-talk(2) ( $\mu\text{V}$ ).I dati sono riportati come media  $\pm$  deviazione standard su 30 canali.

Riguardo alle repliche delle due schede si sono registrati valori inferiori al 6 % per quanto riguarda i risultati del Cross-talk in termini di Output Referred Noise; riguardo all'Input Referred Noise i valori registrati sono risultati inferiori del 10 %. Infine il guadagno è risultato inferiore del 5 %.

Il valori degli Input e Output Referred noise confrontati con quelli ricavati dai test del Cross-Talk sono risultati paragonabili.

In conclusione, alla luce dei risultati ottenuti, si può considerare la validazione soddisfacente nonchè confrontabile con i valori presenti in letteratura; tali risultati verranno meglio discussi nel capitolo 5.

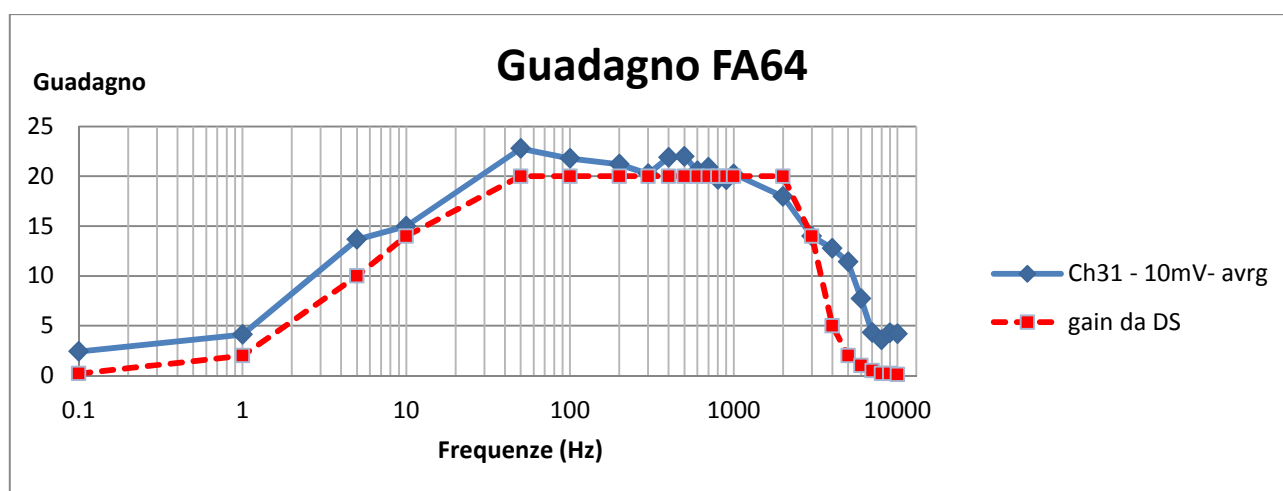
### 2.3 Caratterizzazione del setup costituito da scheda di pre-amplificazione ed amplificatore commerciale

Le registrazioni preliminari di segnali neuronali (Capitolo 4) sono state effettuate con le due schede interne di pre-amplificazione connesse con il filtro commerciale passa banda (10 Hz



- 3 kHz) FA64 (MCS). Tale configurazione è stata quella usata in fase di acquisizione dei segnali dei MEA in attesa della produzione delle schede esterne. In questo paragrafo vengono dunque descritti i test effettuati per caratterizzare questo sistema nel complesso. Innanzitutto è stata verificata la resistenza dei cavi; considerando dai data sheet che la resistenza per metro dei cavi MCS è pari a 1  $\Omega$ /metro la resistenza totale dei cavi utilizzati è risultata pari a 0.5  $\Omega$  per il cavo corto e 1  $\Omega$  per quello più lungo; è stata quindi considerata irrilevante.

È stato ricavato poi il diagramma di Bode del modulo del filtro FA64, fornendo in ingresso sinusoidi ampie 10 mV e con frequenza variabile tra 0.1 Hz e 10000 Hz. Le analisi spettrali di ingresso ed uscita, acquisiti a 25 kHz, sono state effettuate in ambiente Matlab (si veda il paragrafo 2.1 – Test risposta in frequenza). La risposta in frequenza così ottenuta è stata confrontata con quella ricavata dai dati riportati nel datasheet della Multi Channel System (Fig. 2.8).



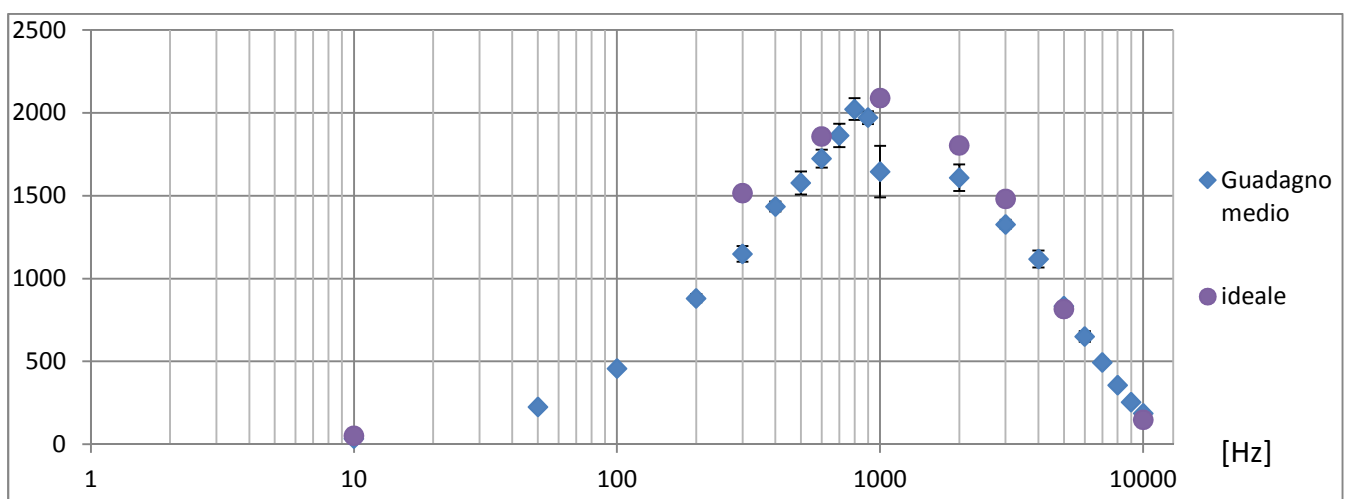
**Figura 2.8.** Confronto tra i diagrammi di Bode del guadagno ideale e del guadagno calcolato del filtro commerciale FA64 (MCS, Multi Channel System).

Il guadagno medio in banda (50 Hz – 1000 Hz) preso dal datasheet è di 20 mentre quello calcolato di 20.984 (errore medio del 4.92 %).

Successivamente si sono testate le PCB interne in serie al filtro amplificatore FA64. Ai canali delle PCB di pre-amplificazione sono stati dati in ingresso sinusoidi in banda 10 Hz – 10000 Hz generati da un generatore di funzioni con ampiezza 100  $\mu$ V; le uscite sono state mandate al sistema commerciale FA64 tramite un cavo MCS; gli ingressi sono stati campionati tramite schedina di acquisizione della National Instrument con frequenza di

campionamento di 24 kHz (per rispettare il teorema di Nyquist che prevede una frequenza di campionamento pari ad almeno il doppio dell'ultima frequenza utile, in questo caso 10 kHz). Successivamente gli spettri sono stati analizzati dopo aver finestrato i segnali con una finestratura di tipo "flat-top", utile per misurare in modo accurato l'ampiezza dello spettro. Le uscite invece sono state raccolte direttamente tramite MCRack (frequenza di campionamento pari a 25 KHz). Il processo è stato eseguito su 3 canali diversi (1 della PCB1 di pre-amplificazione e gli altri 2 della PCB2) (Figura 2.9).

Il guadagno complessivo medio in banda (300 Hz – 3 kHz) misurato è pari a 1632 ( 64 dB). Il guadagno medio simulato delle PCB interne moltiplicato per il guadagno medio misurato del FA64, nella stessa banda, è risultato pari a 1747 ( 65 dB). La differenza tra i due valori è del 6.6 %.

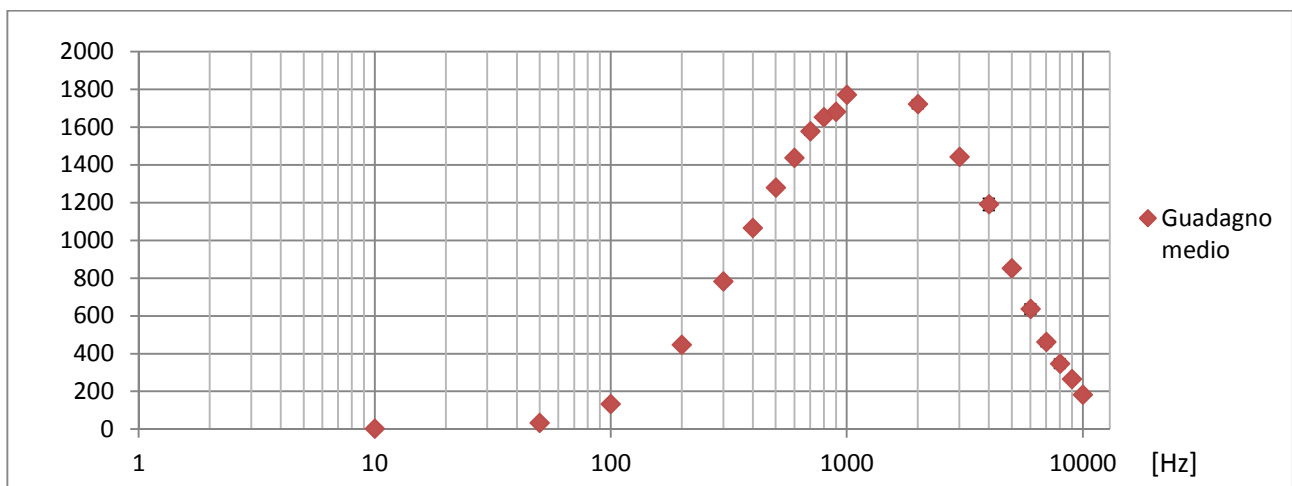


**Figura 2.9.** Confronto tra i diagrammi di Bode del guadagno medio calcolato su 3 canali diversi delle schede di pre-amplificazione accoppiate al filtro FA64 e il guadagno simulato delle PCB interne moltiplicato per il guadagno misurato del FA64.

Nonostante la risposta delle schede accoppiate al FA64 a sinusoidi non presenti alterazioni rispetto all'atteso, bisogna considerare che i segnali provenienti dai MEA presentano un offset intrinseco dovuto ai microelettrodi (che non è stimabile a priori e che varia da sito a sito). Tale offset si presenta inalterato in uscita al primo stadio (poichè le schede di pre-amplificazione hanno un guadagno in DC unitario). Ciò implica la possibilità che il segnale in uscita al primo stadio ed in ingresso a FA64 fuoriesca dall'input voltage range del filtro FA64 (pari a +/- 0.3 V). Per questo si è pensato di inserire immediatamente dopo lo stadio di pre-amplificazione un filtro passivo passa-alto con frequenza del polo pari a 300 Hz, per

abbattere la componente in DC dovuta ai microelettrodi. Tale filtro è stato implementato su una bread-board e replicato per tutti i 60 canali. I valori di resistenza e capacità del filtro sono 24 k e 22 F, rispettivamente. In questo modo è stato possibile accoppiare le schede di pre-amplificazione custom con il filtro amplificatore commerciale, in attesa della produzione del filtro amplificatore custom (che, come si vedrà nel capitolo 3, presenta già un filtro passa alto come primo stadio).

Dopo aver inserito il filtro passa alto, sono state nuovamente misurate le uscite (schede di pre-amplificazione + filtro passa alto + FA64) per 6 canali (3 della PCB1 e 3 della PCB2) (Figura 2.10). Il guadagno medio in banda (300 Hz – 3 kHz) per la PCB1 è risultato pari a 1372 ( 62.74 dB) e per la PCB2 pari a 1368 (62.72 dB).



**Figura 2.10.** Diagramma di Bode del guadagno medio dei canali delle schede di pre-amplificazione (3 della PCB1 e 3 della PCB2) accoppiate a un filtro passa alto passivo seguito dal filtro amplificatore FA64.

## CAPITOLO 3

### 3.1 Progettazione circuito di amplificazione e filtraggio per un canale

In questo capitolo viene descritta la progettazione e realizzazione con Eagle della scheda di amplificazione e filtraggio da accoppiare in cascata alla scheda di pre-amplificazione validata come descritto nel capitolo 2.

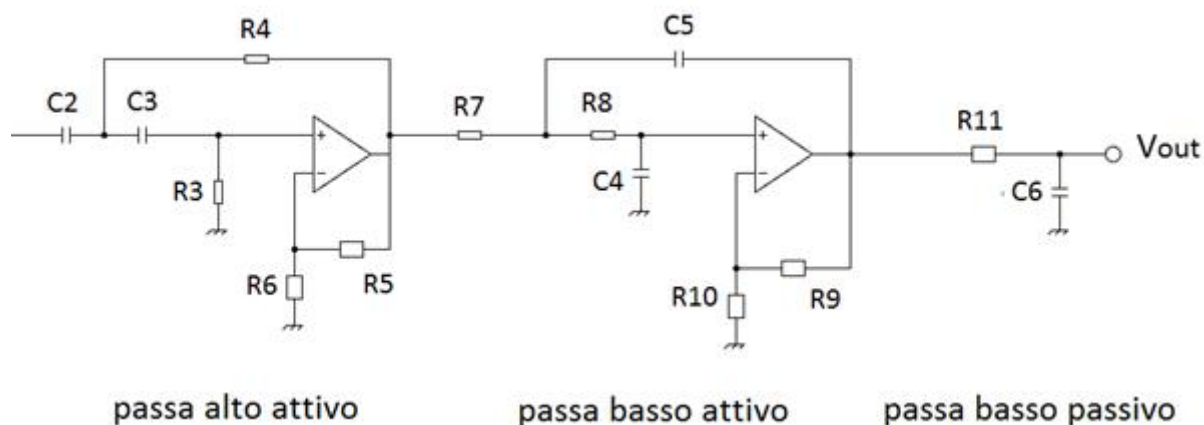
In un precedente lavoro di tesi presso il NearLab (Regalia, 2011) è stato svolto lo studio delle caratteristiche del segnale neuronale. Erano stati analizzati qualitativamente gli spettrogrammi di diversi segnali neuronali acquisiti a banda larga tramite il sistema MCS (1Hz-5kHz, frequenza di campionamento 20 kHz). Utilizzando il software MC\_rack per filtrare digitalmente i segnali tramite filtri di Butterworth si era osservato che la frequenza di 3 kHz è la minima frequenza di un polo passa basso adeguata per non alterare la morfologia del segnale originale e, allo stesso tempo, ottenere un filtro a banda sufficientemente stretta, e non utilizzare dunque frequenze di campionamento troppo alte o un filtro passa basso di ordine molto elevato (e quindi con tanti componenti elettronici) per evitare aliasing. Inoltre, si era constatato che la morfologia e l'ampiezza dei segnali non cambiava variando la frequenza inferiore (passa alto) del filtro passa banda da 100 Hz a 300 Hz. Per garantire una buona attenuazione dell'interferenza di rete (50 Hz), si è scelta come frequenza di taglio inferiore 300 Hz, già utilizzata in altri lavori di letteratura [Pancrazio et al., 2003, Rolston et al., 2009].

In virtù di queste osservazioni si è definita come banda dello spike neuronale l'intervallo 300 Hz - 3 kHz. Il circuito di filtraggio deve dunque garantire un'attenuazione massima di - 3 dB in tale range di frequenze.

La topologia dello stadio di amplificazione e filtraggio per singolo canale progettato in un precedente lavoro di tesi (tesi di G. Regalia, 2011) è formato da un filtro passa alto seguito da un filtro passa basso (Figura 3.1).

Il filtro passa basso è formato da un filtro attivo del secondo ordine e da un filtro passivo (quindi in totale presenta tre poli) mentre il filtro passa alto da un unico filtro attivo del

secondo ordine (quindi in totale presenta due poli). Le celle attive sono state scelte perchè permettono di implementare un filtro del secondo ordine utilizzando un solo amplificatore operazionale (Opamp), riducendo quindi il numero di componenti richiesti e di conseguenza le dimensioni della PCB.



**Figura 3.1.** Schematico del circuito di amplificazione e filtraggio progettato per il singolo canale del MEA. Esso prevede un filtro passa alto attivo del 2 ordine costituito da un passa alto attivo ed un filtro passa basso del 3 ordine costituito da un passa basso attivo e da un passa basso passivo. Entrambi i filtri aggiungono anche un fattore di amplificazione al segnale.

In questo lavoro di tesi, è stato scelto il guadagno di tale circuito ed i componenti sono stati dimensionati per rispondere alle specifiche in termini di banda passante sopra descritte. Le specifiche progettuali complessive sono così riassumibili:

- attenuazione massima di - 3 dB tra 300 Hz e 3 kHz
- guadagno compatibile (cioè non eccedente) con il range di ingresso del successivo stadio di acquisizione (cioè +/- 4 V, sistema USBME64, MCS).
- guadagno massimamente piatto in banda passante

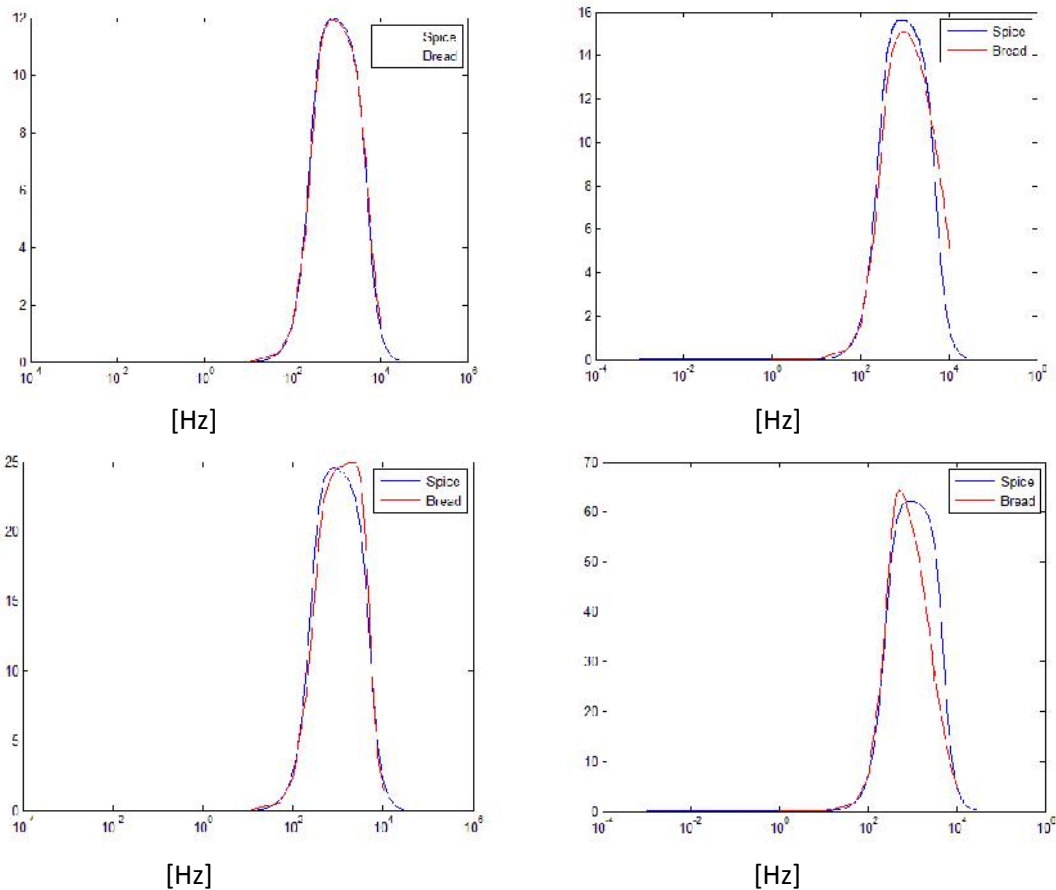
Con l'obiettivo di ottenere una risposta più piatta possibile nella banda passante, tutti i componenti delle celle attive sono stati scelti in modo da ottenere una risposta di tipo Butterworth (tramite l'ausilio del software FilterPro, Texas Instruments).

Riguardo al filtro passa alto, dal momento che un filtro di Butterworth attenua di -3 dB in corrispondenza della frequenza nominale del polo, si è scelto di posizionare il polo esattamente a 300 Hz. Ragionamento analogo potrebbe essere valido per la cella attiva passa basso (polo a 3 kHz), ma, dal momento che viene introdotto un ulteriore polo passa basso dal filtro passivo finale, in questo caso l'attenuazione a 3 kHz potrebbe essere

maggiore di -6 dB. Per rispondere alle specifiche, si è scelto di posizionare i due poli della cella attiva (Butterworth) e quello del filtro passivo alla stessa frequenza di 5 kHz, il che comporta, da simulazioni, un'attenuazione di -3 dB a 3 kHz.

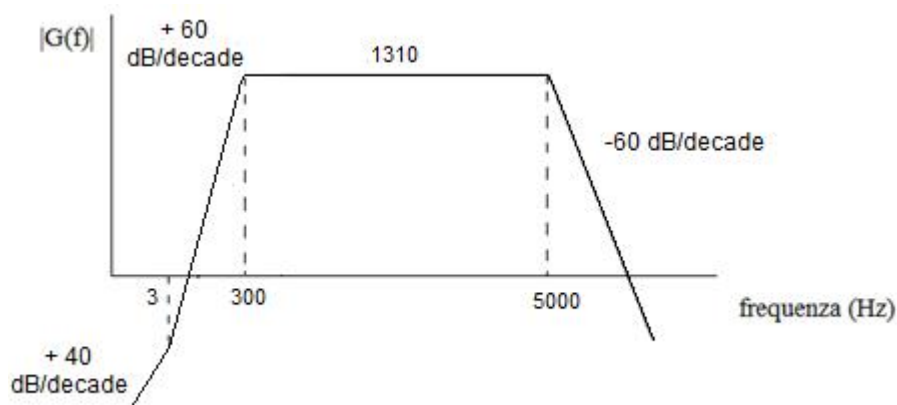
La scelta del guadagno è stata valutata in base a prove sperimentali eseguite su un prototipo a singolo canale realizzato su bread-board. Innanzitutto, si è stabilito di ripartire il guadagno complessivo in modo equivalente sulle due celle attive. Per scegliere l'ordine di grandezza dei valori di guadagno da testare si è considerata un'ampiezza massima dei segnali neuronali pari a 500  $\mu$ V, il guadagno in banda della precedente scheda di pre-amplificazione pari a 100 ed il range in ingresso all'ADC pari a  $\pm$  4 V. Così, si sono definiti come possibili candidati guadagni delle singole celle compresi tra circa 3 e 8 (e quindi guadagni di tutto lo stadio tra 9 e 64). La Figura 3.2 mostra la risposta in frequenza del circuito (sempre di tipo Butterworth) a vari guadagni delle celle attive. In base a tali prove è stato scelto un guadagno di ogni cella attiva pari a circa 3.5 (quindi 12.25 in tutto, equivalente a circa 20 dB complessivi). Infatti, fino a tale valore non si sono osservate sostanziali alterazioni rispetto alla risposta ideale (simulata con Spice). Il valore di 20 dB permette, peraltro, di ottenere un guadagno complessivo di tutto il front-end (pre-amplificazione + amplificazione e filtraggio) di circa 60 dB, valore confrontabile con i sistemi presenti in letteratura ed i sistemi commerciali.

Stabilita la posizione dei poli, il guadagno e la tipologia Butterworth, i valori calcolati dei componenti passivi sono risultati:  $R_3=6.04\text{ k}$  ,  $R_4=10\text{ k}$  ,  $C_2=100\text{ nF}$ ,  $C_3=47\text{ nF}$ ,  $C_7=22\text{ nF}$ ,  $R_{12} = 24.9\text{ k}$  (che determinano la frequenza di taglio del passa alto del secondo ordine);  $R_7=3.16\text{ k}$  ,  $R_8=14.7\text{ k}$  ,  $R_{11}=143$  ,  $C_4=C_5=4.7\text{ nF}$  e  $C_6=220\text{ nF}$  (che determinano la frequenza di taglio del passa basso del terzo ordine);  $R_5=R_9=24.9\text{ k}$  e  $R_6=R_{10}=10\text{ k}$  (che determinano il guadagno delle due celle attive). Il valore di  $R_{11}$  è stato scelto il più basso possibile per evitare l'aggiunta di un buffer tra la scheda e USBME64 che ha un valore di impedenza di ingresso di soli 140 k .



**Figura 3.2.** Grafici elaborati in Matlab dei test per valutare il guadagno tramite prove su breadboard. In blu viene mostrato il grafico ideale calcolato con Spice e in rosso quello reale misurato sperimentalmente su breadboard. Sono confrontati vari valori di guadagno: 3.5 (in alto a sinistra), 4 (in alto a destra), 5 (in basso a sinistra) e 8 (in basso a destra).

Considerando il prodotto tra la funzione di trasferimento del pre-amplificatore e dello stadio di amplificazione e filtraggio, la risposta complessiva teorica del front-end complessivo risulta di tipo passa-banda, con massimo guadagno (ideale) pari a  $107 \cdot 3.5 \cdot 3.5 = 1310$ , 3 poli a 300 Hz e 3 poli a 5kHz (Figura 3.3). Il valore del guadagno complessivo è dello stesso ordine di quello utilizzato per amplificare segnali col sistema MCS ( $G=1100$ ) e a quelli riportati in letteratura per amplificare segnali neuronali [Dabrowski et al., 2004, Wrobel et al., 2006, Borghi et al., 2007, Charvet et al., 2010].



**Figura 3.3.** Diagramma di Bode complessivo dello stadio di pre-amplificazione e di quello di amplificazione.

### Scelta degli amplificatori operazionali

Per implementare lo stadio di amplificazione è stato scelto l'amplificatore OP4177 (Analog Devices, Massachusetts, USA) caratterizzato da:

- Basso rumore pari a circa  $800 \text{ nV}$  da  $1 \text{ kHz}$  a  $10 \text{ kHz}$  ( $8 \text{ nV}/\sqrt{\text{Hz}}$ )
- Bassa corrente di alimentazione:  $400 \text{ }\mu\text{A}$  per amplificatore
- *CMRR* (*common-mode rejection ratio*) minimo di  $120 \text{ dB}$
- Bassa tensione di offset ( $\pm 60 \text{ }\mu\text{V}$ , valore tipico)
- Bassa corrente di bias ( $2 \text{ nA}$ , valore massimo)
- alimentazione duale (da  $\pm 3 \text{ V}$  a  $\pm 12 \text{ V}$ )

Per quanto riguarda gli offset introdotti dagli Opamp dei filtri (ciascuno con guadagno pari a  $3.5$ ), il loro contributo in uscita (sovrastimato a  $\pm 10 \text{ mV}$ , considerando il massimo valore di offset riportato nel datasheet,  $\pm 0.12 \text{ mV}$ ) non è stato ritenuto critico né ai fini della saturazione degli Opamp né ai fini di una successiva fase di detezione dei PA (Potenziali d'Azione).

### Scelta dell'alimentazione

L'OP4177 è stato scelto anche per l'alimentazione duale (da  $\pm 3$  a  $\pm 12 \text{ V}$ ), necessaria data la natura bipolare dei segnali neuronali. Per quanto riguarda l'alimentazione degli operazionali, è stato scelto di alimentare a  $\pm 7 \text{ V}$ , come nel sistema commerciale MCS.



### 3.2 Simulazione in Spice e implementazione singolo canale su bread board

Attraverso il software LTSpice è stato simulato il comportamento in frequenza del guadagno dello stadio di amplificazione e filtraggio (Figura 3.4).

Per tenere conto delle non idealità del circuito è stato prima implementato un singolo canale su bread board; l'uscita del canale è stata mandata in ingresso a una PCB appositamente disegnata per permettere l'interfacciamento con il sistema di acquisizione MCS e visualizzare e memorizzare il segnale di uscita con il software MCRack. L'uscita della bread-board è stata mandata in ingresso a 4 diversi canali della PCB in modo da testare la variabilità a seconda del canale scelto. I segnali d'ingresso sono stati modulati nel range di frequenza 10Hz - 10kHz con durata per singola frequenza pari a 40 secondi. In particolare sono stati analizzati gli ultimi 20 secondi di ogni prova attraverso finestrata rettangolare ed analisi spettrale. Il guadagno calcolato ha mostrato un errore percentuale medio rispetto a quello ideale del 7.34% più basso (figura 3.5).

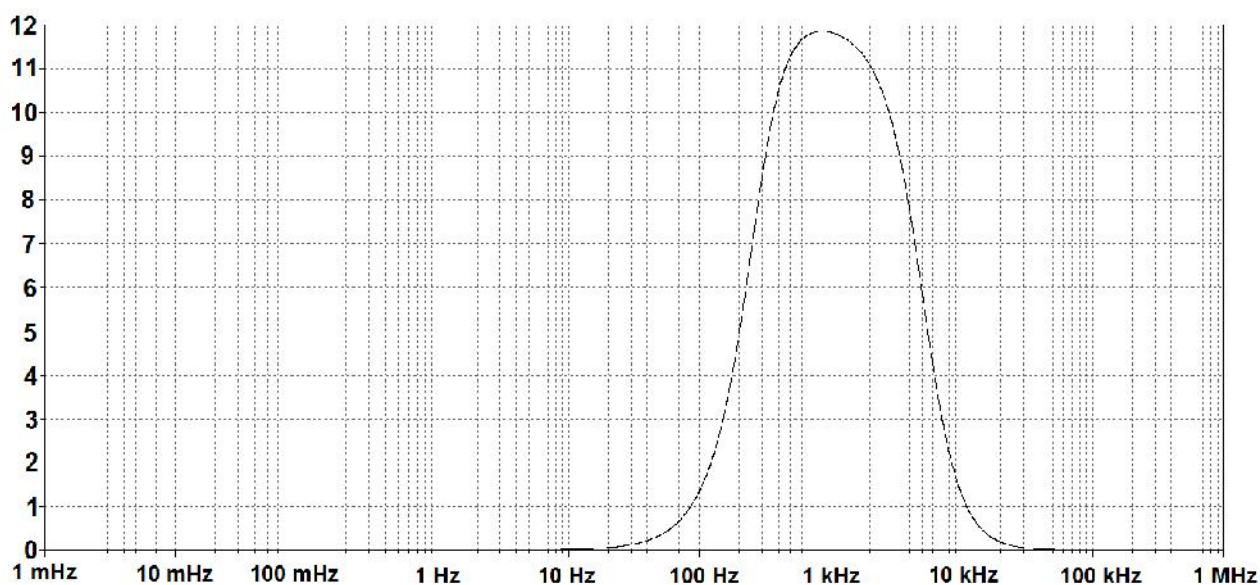


Figura 3.4. Diagramma di Bode del guadagno dello stadio di amplificazione calcolato con LTSpice (Linear Technology).

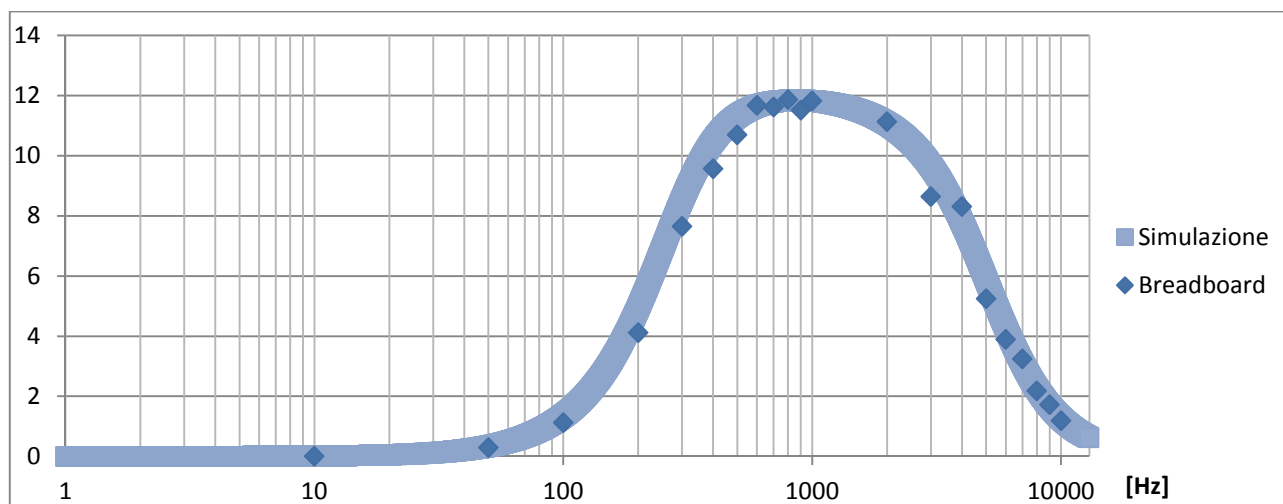


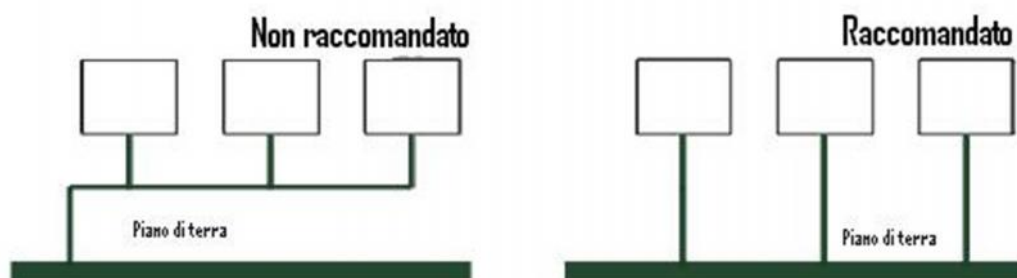
Figura 3.5. Confronto tra il diagramma di Bode del guadagno simulato con LTSpice e quello medio misurato per 4 canali.

### 3.3 Progettazione CAD delle schede di amplificazione e filtraggio a 60 canali

Tramite software EAGLE è stata disegnata la scheda di amplificazione e filtraggio. Per evitare una scheda di dimensioni troppo estese si è deciso di suddividere equamente i 60 canali in due schede (scheda A e scheda B) identiche, ciascuna con l'elettronica di amplificazione e filtraggio per 30 canali. Nel disegno della scheda, sono stati adottati dei criteri per garantire un adeguato funzionamento della scheda, ovvero:

- Sono stati evitati angoli acuti in quanto in essi si concentra il passaggio di corrente con conseguente aumento temperatura e quindi un aumento delle probabilità di bruciatura delle piste.
- Utilizzo di condensatori posti tra le alimentazioni e la massa. Le piste della PCB possiedono una loro resistenza, seppur piccola, e durante i vari picchi di corrente, che possono essere anche di centinaia di mA, fanno abbassare la tensione di alimentazione generando del rumore ad alta frequenza. La presenza del condensatore, che risulta in serie alla resistenza parassita della PCB, forma sia un filtro passa basso che una riserva di energia che permette di ridurre notevolmente le variazioni di tensione sui pin di alimentazione con la conseguente riduzione del rumore generale su tutta la PCB.

- Utilizzo di un piano di massa il più possibile continuo. Un impianto di massa a bassa induttanza è l'elemento più importante per massimizzare la EMC quando si progetta una PCB. Massimizzando l'area di terra su una PCB, si riduce l'induttanza verso terra nell'impianto, che a sua volta ridimensiona le emissioni elettromagnetiche e i crosstalk.
- Il modo in cui un segnale ritorna all'impianto di terra è molto importante perché, quando un segnale prende un percorso più lungo, crea un loop che forma un'antenna e diffonde energia. Quindi, ogni traccia che porta indietro la corrente alla sorgente, dovrebbe seguire il percorso più breve e andare direttamente al piano di terra. Connettere tutte le masse a terra individuali e poi collegarle al piano di terra non è consigliabile perché non solo accresce la dimensione di un loop di corrente, ma aumenta anche la probabilità di ground bounce. Si è quindi cercato di porre a terra tutte le masse individualmente (Figura 3.6).



**Figura 3.6.** Schema di messa a terra dei componenti prevalentemente utilizzato onde prevenire il fenomeno di ground bounce (adattato da [Elettronica Open Source]).

- Distanza più ampia possibile tra le piste (soprattutto tra piste di alimentazione e piste di segnale) compatibilmente con le dimensioni della PCB, onde evitare fenomeni di cross-talk. Un cross-talk può esistere tra due tracce su una PCB ed è una funzione di mutua induttanza e mutua capacitanza proporzionale alla distanza tra le due tracce e l'impedenza delle tracce. La mutua induttanza può essere ridotta aumentando la spaziatura tra le due tracce e/o riducendo la distanza delle piste dal piano di terra. In particolare le piste di alimentazioni sono state poste nella parte alta della PCB e fatte scorrere verso il basso per portare l'alimentazione agli amplificatori operazionali.

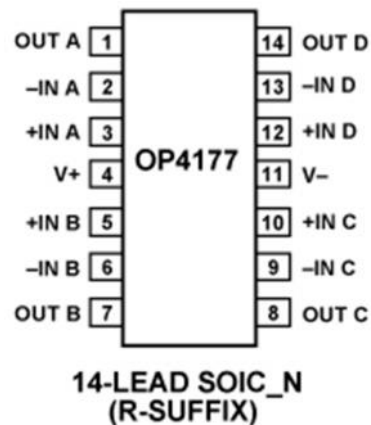
- Evitare la formazione di loop-chiusi con le piste che possono captare i disturbi ambientali e, quindi, aumentare il rumore. Infatti flussi elettromagnetici i potrebbero concatenarsi con tali loop-chiusi creando fenomeni di induzione elettromagnetica.

I componenti passivi utilizzati per la PCB sono componenti a montaggio superficiale con package 0603. Si è scelto il montaggio superficiale a causa dei numerosi vantaggi rispetto alla categoria dei componenti through-hole [Bryan p. et al.], tra i quali:

- Dimensioni e peso ridotte fino ai 2/3 permettendo dunque l'inserimento di più componenti su una PCB a parità di superficie
- Costi di assemblaggio inferiori causa l'utilizzo di macchine pick-and-place (più economiche di quelle usate per i componenti through-hole) utilizzate per la disposizione dei componenti
- I componenti possono essere saldati su entrambi i lati della PCB
- Maggiore resistenza alle vibrazioni e agli shock meccanici
- Maggior affidabilità in quanto diminuiscono gli strati e a loro volta i VIA di interconnessione tra gli strati
- Maggiore interconnettività : possono essere montati con un maggiore numero di interconnessioni per area.

Ovviamente ci sono anche degli svantaggi come il maggior costo e la minor disponibilità dei componenti nonché la minore dissipazione termica che però, nel caso di basse tensioni come quelle utilizzati in questo progetto, risulta facilmente trascurabile.

Il package dell'amplificatore operazionale utilizzato è del tipo SOIC-N 14 pin (figura 3.7). Questo amplificatore è di tipo quad Opamp ovvero in grado di amplificare e filtrare 2 canali d'ingresso (poiché ogni canale è costituito da due amplificatori) in modo da minimizzare il numero dei componenti e la relativa area di superficie. Tale package risulta occupare un'area del 30–50% minore dell' equivalente DIP (Dual in-line package) con uno spessore inferiore del 70 %. In totale per la singola scheda a 30 canali sono stati utilizzati 15 amplificatori operazionali.



**Figura 3.7.** Package dell'amplificatore operazione OP4177 a 4 canali utilizzato per la realizzazione della PCB.

Le PCB così realizzate sono di dimensione 108.00 mm X 108.00 mm (Figura 3.8, 3.9). Ai 4 estremi sono stati posti 4 fori per permettere successivamente l'alloggio delle schede all'interno di un case progettato appositamente per esse.

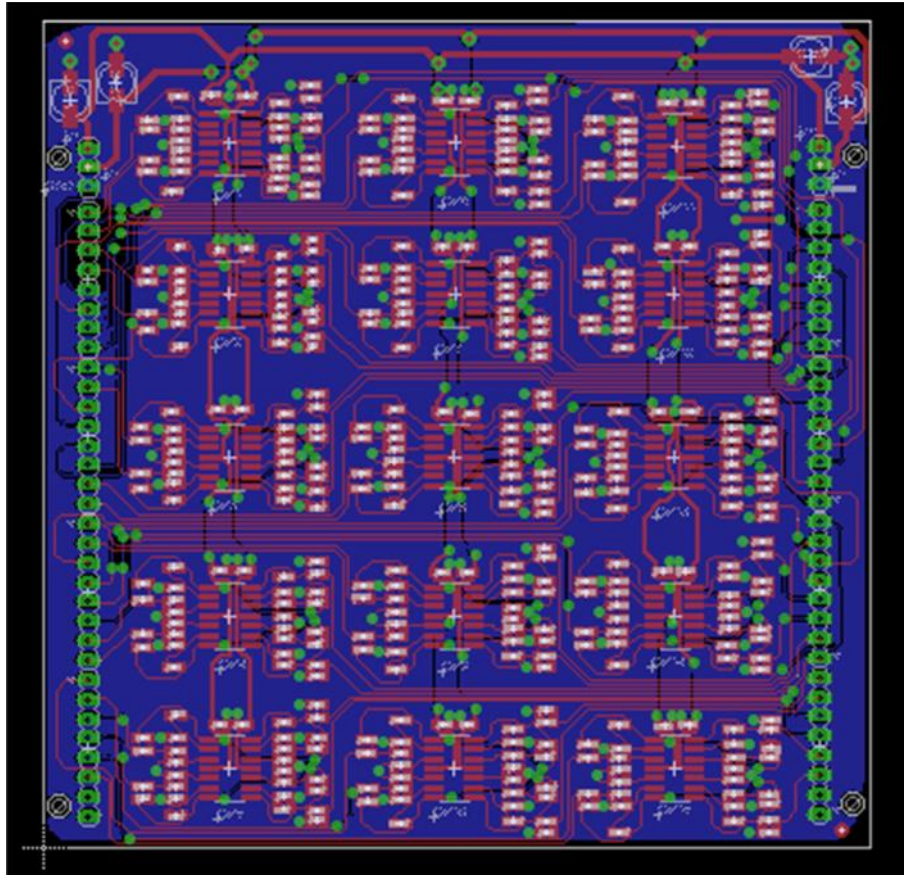
Visti i sopracitati criteri si è scelto di dedicare un intero strato al piano di massa (nel nostro caso lo strato inferiore) e un altro (quello superiore) ai componenti e alle piste in modo da lasciare il più continuo possibile il piano di massa. Inoltre le alimentazioni, dato il voltaggio di pista maggiore, sono state poste il più lontano possibile dalle piste di segnale onde evitare possibili interferenze elettromagnetiche; inoltre sono state disposte in modo da evitare la formazione di loop chiusi: partendo dalla zona superiore della PCB raggiungono, scorrendo verso il basso, i vari amplificatori in modo da formare 3 colonne collegate fra di loro solo nella parte superiore.

Riguardo alla dimensione delle piste si è scelto una dimensione di 0.254 mm (10 mil) per le piste dei segnali e di 0.8128 mm (32 mil) per le piste di alimentazione.

Infine, riguardo alla dimensione dei VIA, tramite i quali le piste passano da uno strato all'altro della scheda, è stato scelto un diametro minimo di 0.6 mm (23.6 mil) per le piste di segnale e di 1.2 mm (47.2 mil) per quelle di alimentazione.

Infine sono state progettate due PCB di connessione per permettere l'interfacciamento delle schede di amplificazione e filtraggio con l'elettronica a monte (schede di pre-amplificazione custom descritte nel capitolo 1 e validate nel capitolo 2) e con l'elettronica a valle (ADC commerciale Multi Channel System GmbH) tramite cavo a 68-pin MCS. Anche in questo

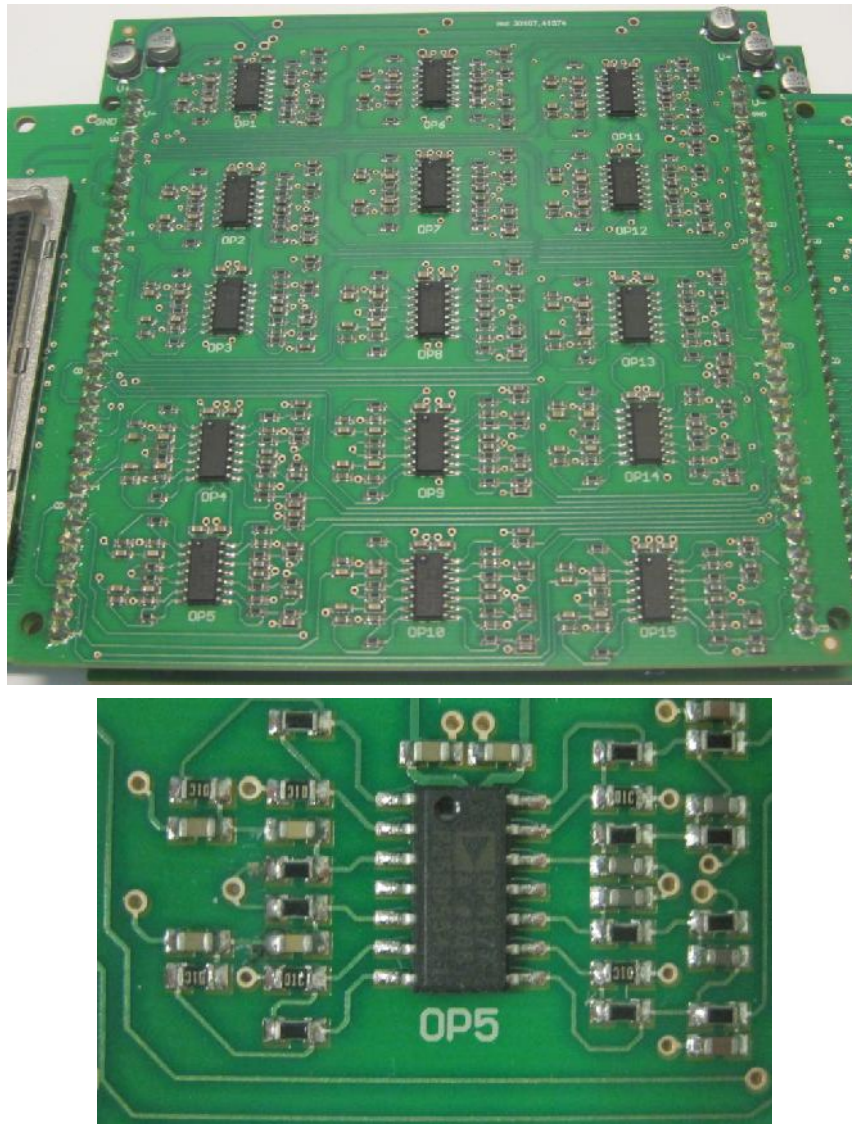
caso è stata adottata una distanza tra le piste minima pari a quella adottata per le schede di filtraggio. Le dimensioni delle PCB di interfacciamento sono di 9.25 cm x 3.9 cm (Figura 3.10),



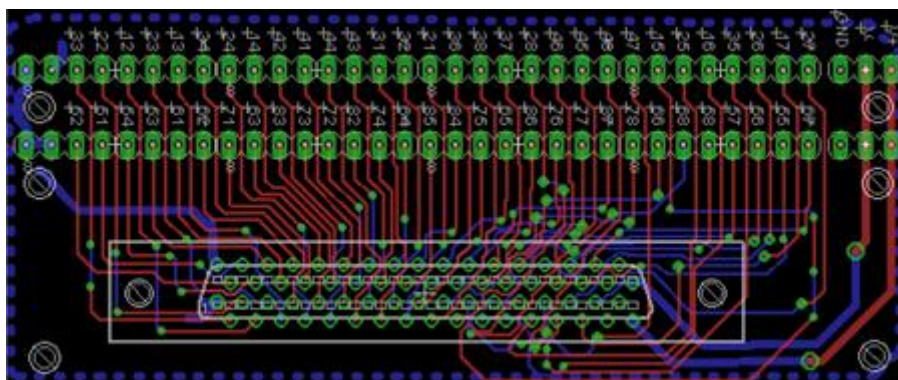
**Figura 3.8.** Immagine del CAD di una delle due PCB a 30 canali. Ai lati destro e sinistro si possono vedere le file dei canali di ingresso e di uscita del segnale. Le capacità elettrolitiche sono poste vicino all'ingresso e all'uscita delle due alimentazioni (rispettivamente in alto a sinistra e in alto a destra).

Le schede descritte sono state fatte stampare presso la ditta Millennium Dataware srl e assemblate presso la ditta Elimont srl.





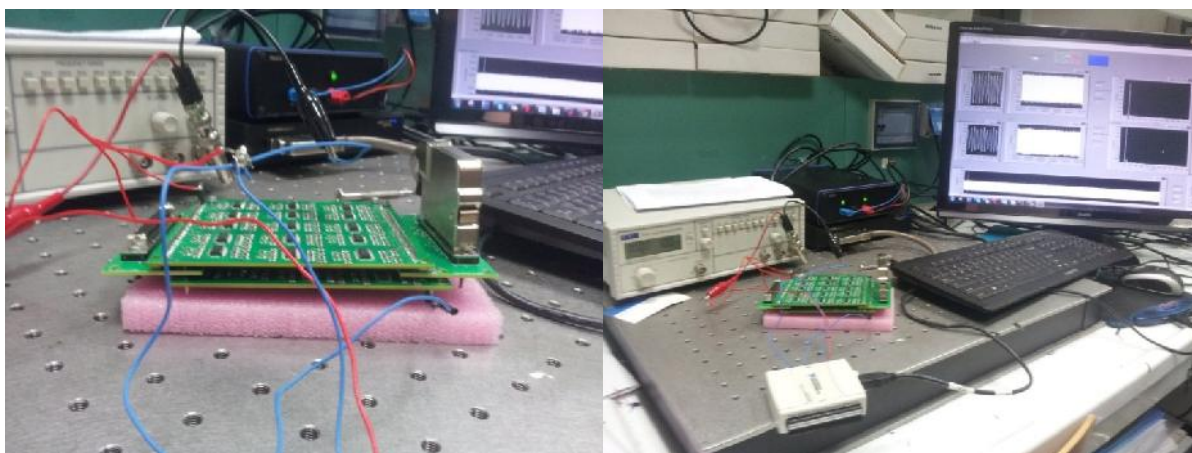
**Figura 3.9.** (Sopra) Foto della PCB esterna di amplificazione e filtraggio. (Sotto) Fotografia di uno dei quad-opamp e delle relative capacità e resistenze che costituiscono i filtri utilizzati per le schede esterne. Ogni quad-opamp è utilizzato per realizzare due canali (due opamp per canale).



**Figura 3.10.** Immagine del CAD della PCB che permette l'interfacciamento tra il sistema di amplificazione custom e il sistema di acquisizione commerciale.

### 3.4 Validazione delle schede di amplificazione e filtraggio a 60 canali

Come per le schede di pre-amplificazione, anche per le schede di amplificazione sono stati svolti test atti a certificare il corretto e previsto funzionamento della scheda, ovvero i test di alimentazione, i test dell'offset, i test dell'Input e Output Referred Noise (eseguiti però su bande diverse la scomposizione del segnale), i test sulla risposta in frequenza (sinusoide in ingresso di ampiezza 10 mV e frequenza 10 Hz – 10 kHz), i test DC input e i test sul cross talk (Capitolo 2). In figura 3.11 viene mostrato il set-up sperimentale per il test delle schede, costituito da un generatore di funzioni (GPS-4303, Instek), le schede (assemblate una sopra l'altra), il dispositivo di digitalizzazione commerciale con cui digitalizzare l'uscita (MCS) (frequenza di campionamento impostata a 25 kHz) ed un PC con cui si è registrato sia il segnale in ingresso, tramite scheda di acquisizione Ni USB-6009 (frequenza di campionamento impostata a 25 kHz) e software Labview, sia il segnale di uscita dai canali tramite software MCRack. In questo caso è stata testata una sola delle due copie di PCB identiche.



**Figura 3.11.** Fotografia del set-up sperimentale adottato. A sinistra è visualizzata la scheda esterna con i connettori MCS che oltre a fornire l'alimentazione, trasmettono l'output al sistema MCS. A destra è mostrata la PCB con il generatore di funzioni (a destra) che fornisce le sinusoidi in input, la scheda di acquisizione USB-6009 e il computer che registra il segnale di uscita, tramite software McRack, contemporaneamente a quello di ingresso tramite software LabView.



### 3.4.1 Risultati

#### Test di alimentazione

L'alimentazione ai capi degli amplificatori rispecchia quella misurata all'uscita dell'alimentatore da banco, per tutti gli amplificatori presenti in PCB1, PCB2 e nelle loro repliche. Riguardo alla corrente assorbita dalle linee di alimentazione, è stata misurata una corrente di quasi 30 mA (sia dalla linea positiva sia da quella negativa), maggiore di quello predetto tramite il dato di corrente di quiescenza degli Opamp avendo trascurato il calcolo della potenza dissipata dai componenti passivi.

#### Test dell'offset

L'offset è sempre rimasto minore di 1 mV per tutti i canali della PCB.

#### Test risposta in frequenza

Il guadagno medio misurato in banda (300 Hz – 5 kHz) è risultato pari a 10.04 (20.03 dB) (figura 3.12) e differisce del 4.48 % rispetto a quello simulato.

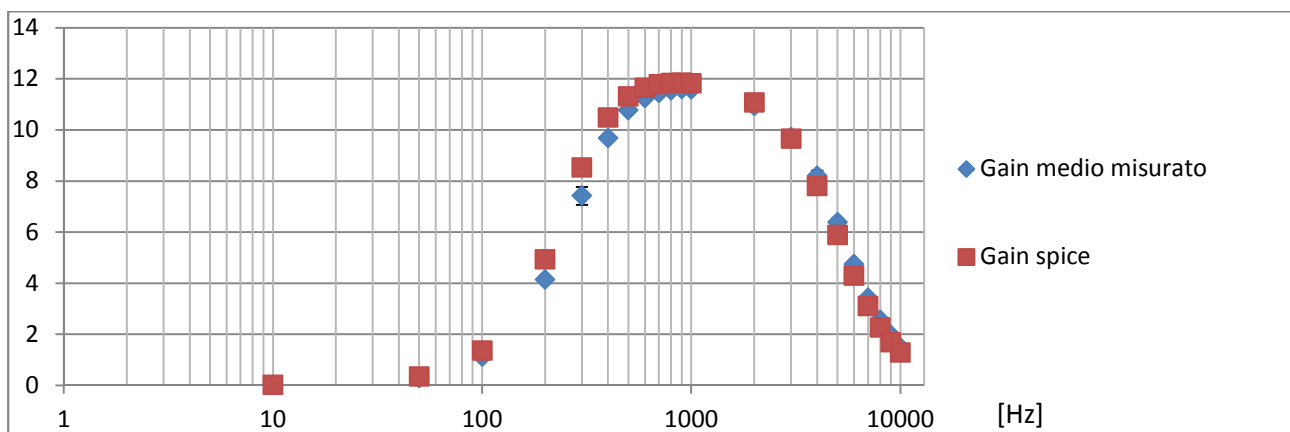


Figura 3.12. Diagramma di Bode del guadagno medio misurato e simulato della PCB esterna.

#### Test Input e Output Referred Noise

Il segnale in uscita ha presentato un valore medio picco-picco di 5.89 mV e una deviazione standard di 0.77 mV. Il segnale scomposto in 3 diverse bande (300 Hz – 3 kHz, 0.01 Hz – 12 kHz, 300 Hz – 5 kHz) è rappresentato in Tabella 3.1.

	<b>300 Hz – 3 kHz</b>	<b>0.01 Hz – 12.1 kHz</b>	<b>300 Hz – 5 kHz</b>
<b>PCB</b>	0.50 mV (0.03 mV)	0.77 mV (0.04 mV)	0.61 mV (0.03 mV)

**Tabella 3.1.** Risultati del test di Output-Referred Noise. Sono indicate prima le medie su 30 canali e poi, in parentesi, le deviazioni standard.

L'Input-Referred Noise è stato stimato dividendo per il guadagno medio in banda misurato (10.044). L'Input-Referred Noise è risultato, in banda 300 Hz – 5 kHz, 0.048 mV (deviazione standard pari a 0.0038 mV).

L'Input Referred Noise è risultato inferiore all' Output Referred Noise delle schede di pre-amplificazione (Capitolo 2) e quindi il rumore che arriva in ingresso alle schede esterne è maggiore rispetto a quello che loro stesso introducono.

### Test Cross-Talk

La sinusoide utilizzata in questo test è stata generata con ampiezza di 5mV e frequenza 1 kHz. L'Output Referred Noise del Cross Talk ha presentato un valore picco-picco pari a 13.99 mV. Il segnale scomposto in 3 bande viene presentato in Tabella 3.2.

	<b>300 Hz – 3 kHz</b>	<b>0.01 Hz – 12 kHz</b>	<b>300 Hz – 5 kHz</b>
<b>PCB</b>	0.79 mV (0.96 mV)	1.01 mV (0.88 mV)	1.00 mV (0.88 mV)

**Tabella 3.2.** Risultati del test di Output-Referred noise del Cross-Talk.

Ai valori calcolati è stato sottratto il rumore della schedina in termini RMS e diviso per il guadagno medio in banda misurato (10.04) per il calcolo dell'input-referred noise in banda. In banda è stato dunque misurato un valore pari a 0.09 mV.

Il guadagno medio di cross talk è risultato pari a 0.002 (- 54 dB) (deviazione standard=0.0007).

## CAPITOLO 4

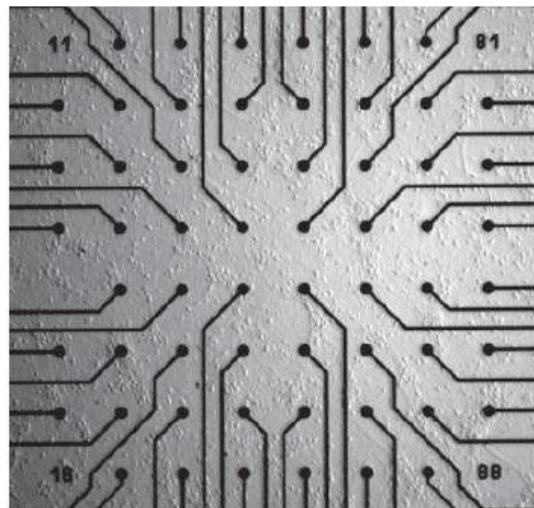
### 4.1 Descrizione protocollo di coltura e di registrazione

Le colture neuronali primarie utilizzate nelle prove di registrazione sono state ottenute da topo CD1 al diciassettesimo giorno di gestazione (E17.5) ovvero in una fase in cui l'embrione costituisce una sorgente pura di neuroni, poichè non è presente la componente gliale e la popolazione che si ottiene è una popolazione omogenea di neuroni. Gli ippocampi estratti tramite una procedura di dissezione standard sono stati lavati con HBSS (Hank's balanced salt solution) utile a mantenere un pH stabile e a fornire alle cellule acqua e ioni inorganici essenziali. Successivamente sono stati trattati con Tripsina (0.25 %; Sigma-Aldrich), un enzima proteico, per 15 minuti a 37 °C. Gli ippocampi sono quindi stati ri-sospesi in *plating medium* preparato il giorno precedente e dissociati meccanicamente con una pipetta di vetro per separare le cellule tra di loro. Su ogni MEA sono state depositate cellule in modo da ottenere una densità di circa 800 cellule/mm<sup>2</sup>, quantità sufficiente a garantire la formazione di una fitta rete sopra gli elettrodi. I MEA sono stati poi deposti in un incubatore a 37 °C per 4 ore in modo da favorire l'adesione cellulare. Infine il terreno è stato sostituito con 1 ml di *culturing medium* (NBM, B-27 1x, 1% P/S, Glutamax 1 mM e Hepes 10 mM pH 7.4 (Lonza)), simile a quello utilizzato per la piastratura ma arricchito con glutammina, utile al metabolismo neuronale.

Prima della piastratura delle cellule, i MEA, precedentemente trattati con plasma di aria per migliorare l'adesione cellulare, sono stati sterilizzati con un trattamento di 12 ore in stufa a 110 °C e poi riempiti per 4 ore con terreno ricco di siero (*plating medium* (NBM, 10%FBS, 1% P/S)) per aumentare la loro idrofilicità. Successivamente, sono stati trattati per 12 ore in incubatore con poly-L-lisina (2 mg/ml). In seguito i MEA sono stati lavati attentamente con PBS sterile. Il pozzetto è stato poi riempito nuovamente di mezzo ricco di siero ed i MEA sono stati mantenuti

in incubatore fino alla piastratura delle cellule con mezzo di coltura (come sopra descritto).

I dispositivi utilizzati in questi esperimenti sono i MEA 200-30-iR-Ti-gr (MCS, Figura 4.1), costituiti da una griglia 8x8 di 60 elettrodi circolari in nitruro di titanio (TiN), con piste e pad in titanio (Ti) ed isolante tra gli elettrodi in nitruro di silicio (SiN). Gli elettrodi distano tra loro 200  $\mu\text{m}$  ed hanno diametro pari a 30  $\mu\text{m}$ . Attorno all'area attiva del MEA è posizionato un anello in vetro (gr) adibito a contenere il mezzo cellulare e la coltura neuronale.

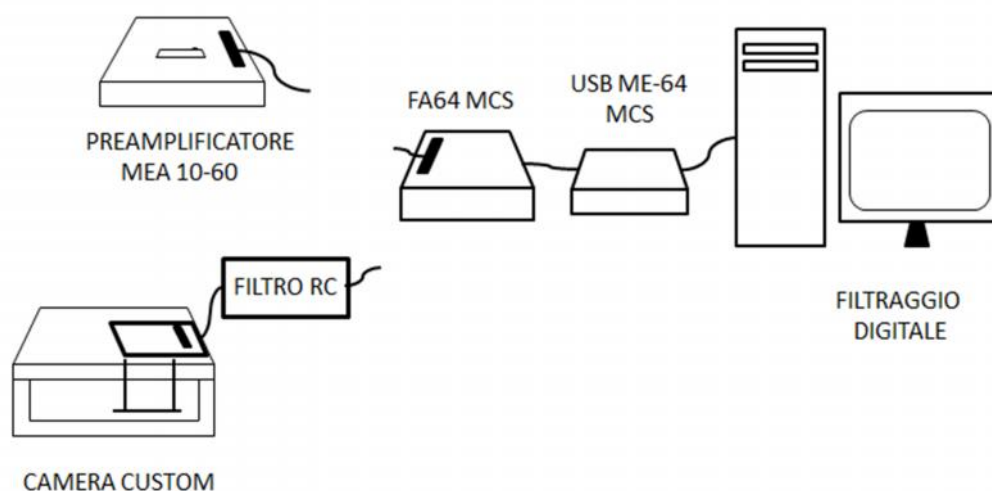


**Figura 4.1.** Microelectrode array (MEA) utilizzato per registrare l'attività delle colture neuronali. A sinistra: MEA 200-30-iR-Ti-gr (MCS), con elettrodi in nitruro di titanio (TiN), isolante in nitruro di silicio (SiN), pad di contatto e piste in titanio (Ti) ed elettrodo di riferimento interno (evidenziato in nero a sinistra). A destra: layout del MEA, con 60 elettrodi, disposti in una griglia 8x8; distanza tra gli elettrodi: 200  $\mu\text{m}$ ; diametro degli elettrodi: 30  $\mu\text{m}$ .

Le registrazioni elettrofisiologiche dai MEA sono state effettuate utilizzando due possibili setup: quello custom e quello commerciale (MCS). In questo modo si sono potute verificare le performances del setup custom rispetto ad un gold standard. Il setup custom è costituito dalla camera di controllo ambientale, un filtro passivo passa-alto implementato su breadboard per tutti i 60 canali, l'amplificatore FA64 (MCS) e il sistema di acquisizione dati USB-ME64 (frequenza di campionamento fino a 50 kHz; risoluzione 16 bit) che lo interfaccia con un computer tramite comunicazione USB. Tale setup ha un guadagno complessivo di circa 2000 in banda e una banda passante pari a 300 Hz – 3 kHz (Figura 4.2). Il setup commerciale è formato dal pre-amplificatore della MCS (MEA-1060-Inv-BC-Standard, MCS), l'amplificatore FA64 e il sistema USB-ME64; tale setup ha un guadagno complessivo di 1100 e una banda passante di 10 Hz – 3 kHz (Figura 4.2). Quindi i due setup differiscono essenzialmente per il primo stadio di pre-amplificazione.

Con questi setup si sono effettuate registrazioni brevi (senza controllo ambientale) descritte nel paragrafo 4.2 e prolungate (con controllo ambientale) descritte nel paragrafo 4.3.

La configurazione utilizzata per la registrazione è indicata in figura 4.2 (schede interne di pre-amplificazione, filtro RC passa alto implementato per tutti i 60 canali su breadboard e filtro commerciale FA64). Per confrontare le registrazioni con il sistema commerciale, le cellule sono state registrate anche con il sistema commerciale fornito dalla MCS. In questo secondo caso è stato applicato un filtro digitale passa alto a 300 Hz.



**Figura 4.2.** Set-up di registrazione utilizzato in fase di registrazione delle colture. A partire da sinistra, in basso si vede la camera di registrazione con le schede di pre-amplificazione poste all'interno e il filtro RC passa alto implementato su breadboard. In alto il pre-amplificatore commerciale MEA 10-60. Proseguendo verso destra, il front-end commerciale FA64, l'ADC commerciale e il computer che si interfaccia tramite software MCRack e che permette un ulteriore filtraggio digitale.

Il software di acquisizione utilizzato è MCRack (Multi Channel System, MCS GmbH). Tale software permette di visualizzare contemporaneamente i 60 canali dei MEA, dopo averli divisi per il guadagno hardware, impostato dall'utente, in modo da visualizzare l'ampiezza riferita all'ingresso. Tale guadagno di amplificazione del segnale è stato fissato a 1100 nel caso di set-up commerciale e 2000 per il setup con pre-amplificazione custom. Tali valori sono in accordo con il guadagno medio in banda dei rispettivi setup. La frequenza di campionamento è stata impostata a 25 kHz, corrispondente a più del doppio della massima frequenza della banda passante del set-up custom; ciò, in accordo al Teorema di Shannon, evita fenomeni di aliasing del segnale.

A partire dalle registrazioni effettuate, gli spike neuronali sono stati individuati confrontando il segnale con una soglia negativa pari a cinque volte la deviazione standard dell'ampiezza del rumore medio acquisito nei primi 500 ms [Biffi et al., 2011].

I parametri valutati per confrontare le due colture sono stati:

- il SNR (Signal-to-Noise Ratio), definito per ogni spike come il rapporto tra l'ampiezza picco-picco dello spike e l'ampiezza picco-picco del rumore, valutata nei primi 500 ms di ogni registrazione. I valori di SNR degli spike dello stesso canale sono stati mediati. I valori medi di ogni canale sono stati poi mediati per avere un'indicazione del SNR medio della coltura.

- la frequenza di sparo, definita come l'inverso dell'intervallo tra due spike. La frequenza è stata mediata su ogni canale. I valori medi di ogni canale sono stati poi mediati per avere un'indicazione della frequenza media della coltura.

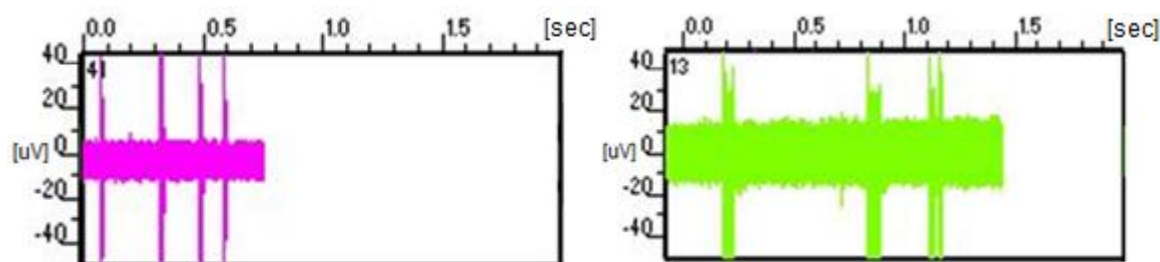
- la morfologia degli spike, valutata qualitativamente dopo aver estratto gli spike in un intervallo temporale tra -1 ms e + 2 ms rispetto all'istante di superamento della soglia.

## **4.2 Validazione delle schede di pre-amplificazione con cellule**

Per questa validazione sono state effettuate registrazioni di 4 colture dopo il diciottesimo DIV (*days in vitro*) ovvero 18 giorni dopo che la coltura è stata deposta sul MEA, quando si suppone che la rete possieda una stabile attività elettrofisiologica. Poichè per tale validazione si era interessati a verificare l'effettivo funzionamento della sola elettronica, la durata delle registrazioni è stata fissata tra i 20 e i 60 secondi. Le registrazioni sono state effettuate posizionando ogni coltura su MEA prima nel setup commerciale (dotato di controllo di temperatura) e poi nel setup custom (nella camera ambientale senza controllo ambientale). Prima di iniziare ogni registrazione si sono aspettati 5 minuti per evitare l'effetto dello spostamento fisico dei MEA.

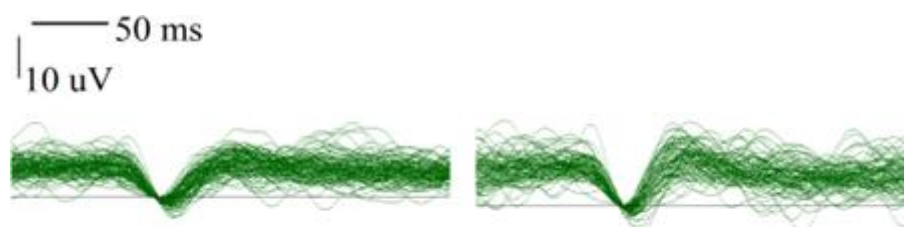
Le analisi delle registrazioni effettuate con i due setup hanno evidenziato comparabilità tra i due sistemi sia in termini di SNR medio delle colture (5.40 dB per il set-up custom e 5.46 dB per il set-up commerciale, dati mediati su 4 colture) sia in termini di frequenza media (1.5 Hz per il set-up custom e 2.5 Hz per quello commerciale, dati mediati su 4 colture). Tali valori sono inoltre comparabili con i valori presenti in letteratura (Rolston et al., 2009).

Il tipo di attività è risultato comparabile per i due setup (Figura 4.3).



**Figura 4.3.** Andamento temporale dell'attività di un canale della medesima coltura (28 DIV) registrata inizialmente con set-up commerciale (figura a sinistra) e successivamente con set-up custom (figura a destra).

Riguardo la morfologia dello spike (Figura 4.4), si è constatato che le schede di pre-amplificazione custom non distorcono la forma d'onda degli spike, preservandone il tipico andamento bifasico.



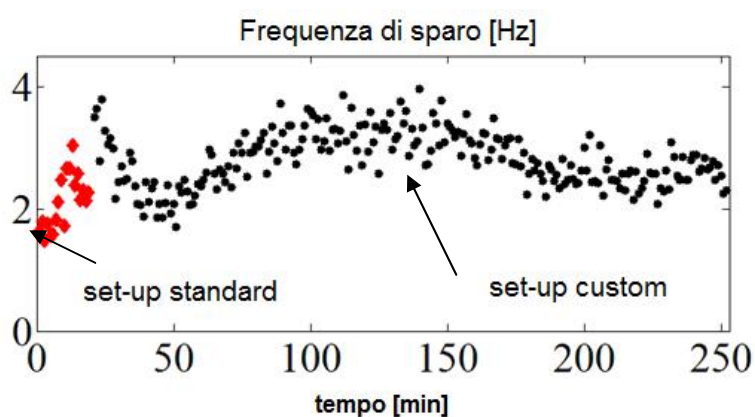
**Figura 4.4.** Confronto di forme d'onda degli spike (3 ms) registrate dagli stessi microelettrodi e dalla stessa coltura con set-up commerciale (sinistra) e con il set-up custom (destra).

### 4.3 Validazione della piattaforma sperimentale per registrazioni a lungo termine

Per validare la piattaforma sperimentale, costituita dalla camera ambientale controllata (controllo della temperatura per mantenerla a 37 °C e controllo della fase gassosa per ottenere 5% di CO<sub>2</sub>) con integrate le schede di pre-amplificazione, sono state eseguite registrazioni prolungate a diverse ore, su due colture neuronali registrate al quattordicesimo DIV(>2 ore).

I risultati di tale indagine mostrano che le cellule all'interno della camera ambientale non subiscono la riduzione dell'attività elettrica che tipicamente occorrerebbe con i set-up tradizionali quando le registrazioni hanno durata maggiore di 2 ore [Biffi et al., 2012].

In Figura 4.5 è infatti riportata la frequenza di sparo media (calcolata su finestre temporali di 1 minuto) di una coltura neuronale registrata inizialmente (durante i primi 20 minuti) tramite set-up commerciale MCS e per le successive 4 ore tramite il set-up custom. Nonostante un effetto iniziale di smorzamento dell'attività, dovuto presumibilmente a stress di temperatura e meccanici, l'attività neuronale mostra una stabilizzazione durante tutto l'arco del tempo di osservazione. Tale frequenza di sparo è caratterizzata da un valore medio pari a 2.6 Hz e deviazioni dal valore medio di  $\pm 0.78$  Hz. Tali valori sono comparabili con quelli dell'attività tipica registrata per periodi di tempo brevi dal set-up commerciale dimostrando l'affidabilità del sistema per registrazioni a lungo termine.



**Figura 4.5.** Frequenza di sparo di una coltura neuronale registrata per i primi 20 minuti con il set-up standard e successivamente tramite set-up custom. Sono riportati i valori medi di frequenza in intervalli temporali di 1 minuto.



## ***CAPITOLO 5***

### **5.1 Discussione**

Questo lavoro di tesi rientra nell'ambito del progetto di una piattaforma sperimentale compatta ideata sia per la coltura sia per il monitoraggio dell'attività elettrofisiologica di cellule neuronali cresciute su matrici di microelettrodi (MEA) [Biffi et al., 2012]. Tale sistema si presenta innovativo rispetto alla tecnologia presente in letteratura perchè elimina le fluttuazioni ambientali durante gli esperimenti, riducendo la mortalità cellulare. Ciò permette sia di raccogliere dati da MEA affidabili e riproducibili sia di condurre esperimenti prolungati nel tempo, per indagare meccanismi neuronali non osservabili o non esauribili nel periodo di tempo consentito dalla metodica standard (circa 2 ore).

Il primo obiettivo perseguito in questo lavoro di tesi è stato di progettare e validare l'elettronica per registrare i segnali dai MEA posti nella camera ambientale. Il secondo obiettivo è stato convalidare l'applicabilità del sistema per registrazioni prolungate nel tempo (cioè maggiori di 2 ore).

Prima di questo lavoro di tesi erano state progettate schede di pre-amplificazione da integrare alla camera per non degradare il SNR [Bai and wise, Regalia]. L'esigenza di avere schede di pre-amplificazione ad hoc per risolvere tale problema è nata dal fatto che non esistevano schede commerciali da essere inserite fisicamente all'interno della camera. In questa tesi si sono validate tali schede, con l'obiettivo di verificare se i requisiti di progetto fossero stati rispettati.

Un parametro critico riguardo la loro progettazione è il noise; infatti esiste già una componente di noise in uscita agli elettrodi e i segnali neuronali, di bassa ampiezza, rischiano di non essere rilevati. Dai test di Input Referred Noise si è constatato che in banda spike (300 Hz – 3 kHz) i valori di noise sono risultati inferiori a quelli in uscita dai microelettrodi e paragonabili a quelli di sistemi commerciali e custom presenti in letteratura. L'ampiezza di tali valori non risulta essere compromettente per la corretta identificazione

degli spikes : infatti l'algoritmo di calcolo prevede che la soglia di detezione degli spikes tenga conto del rumore medio acquisito nei primi 500 ms.

Un altro parametro critico è il cross-talk soprattutto in schede di piccole dimensioni in cui tanti canali utilizzano piste vicine e parallele; tale parametro, riportato in in ingresso, è risultato paragonabile all'Input Referred Noise in banda spike (300 Hz – 3 kHz). Questo fatto significa che la sinusoide generata in ingresso non influenza i canali vicini; a ulteriore verifica si è misurato un guadagno di cross-talk paragonabile a quello di letteratura. Infine, riguardo alla risposta in frequenza, si è osservata una differenza rispetto alle simulazioni inferiore al 10 % in banda passante. E' considerabile un valore accettabile tenendo conto sia le tolleranze inevitabili dei componenti sia le non idealità delle simulazioni.

Riguardo alle schede interne di pre-amplificazione si può affermare che le performance ottenute sono risultate simili a quelle attese dal progetto e dalle simulazioni (Capitolo 2).

Per escludere il filtro FA64 commerciale e interfacciare direttamente il sistema con il convertitore analogico-digitale è stato progettato e realizzato un secondo stadio di amplificazione e filtraggio da porre in cascata a quello di pre-amplificazione interno alla camera ambientale (Capitolo 3). Per interfacciare le schede interne con il filtro FA64 è necessario interporre un filtro RC per problemi di Input Voltage Range; tale filtro richiederebbe ovviamente un maggior numero di componenti facendo perdere di compattezza il nostro setup. E' stato dunque preferito progettare una scheda di filtraggio e amplificazione ad hoc accoppiabile a quelle interne già esistenti. La risposta in frequenza di tale configurazione è un passa banda (300 Hz – 3 kHz) con pendenza a sinistra delle banda passante di +60 dB/decade e a destra di -60 dB/decade. Tale risposta risulterebbe simmetrica e più selettiva per gli spike e non, ad esempio, per oscillazioni lente o potenziali di campo locali. La progettazione di una scheda propria permette la possibilità di decidere e regolare i parametri in caso di problemi di interfacciamento tra diverse parti rispetto a usarne una già fatta.

A livello di progettazione circuitale si sono dimensionati i componenti e scelto il guadagno, avendo dei vincoli progettuali sulla topologia (una cella butterworth passa alto seguita da una passa basso e da un ulteriore filtro passa basso passivo) decisa facendo delle prove su un prototipo a singolo canale per confermare la bontà del dimensionamento eseguito.

Il disegno CAD di queste schede ha previsto l'utilizzo di criteri per rendere il più efficiente possibile il loro funzionamento come la minimizzazione del fenomeno di cross-talk tramite distanziatura tra piste di alimentazione e piste di segnale, utilizzo di componenti smd solo su uno strato in modo da creare un piano di massa il più ampio e continuo possibile sull'altro (Capitolo 3.3) per ridurre le emissioni elettromagnetiche e gli effetti di crosstalk e cercare di replicare in modo identico i percorsi dei canali per massimizzare la somiglianza dei segnali nei diversi canali. Inoltre deve essere considerato che è stata disegnata una scheda (a 30 canali) la cui replica sarà utilizzata per gli altri 30 canali risparmiando i costi di realizzazione di un'altra PCB; infatti grazie alla sua simmetria è possibile assemblarla alle due schede contenenti i connettori insieme alla sua replica e formando uno stadio di amplificazione e filtraggio per 60 canali.

Per quanto concerne la validazione di queste PCB, i dati raccolti durante i test hanno, complessivamente, evidenziato un funzionamento delle PCB rispondente a quello atteso da calcoli e software di simulazione. Inoltre, non si sono mai osservate discrepanze significative tra i segnali provenienti da diversi canali, ad indicare che tutti vengono amplificati e filtrati dagli amplificatori nello stesso modo.

La risposta in frequenza della PCB ha mostrato un valore inferiore del 4.48 % in banda passante (300 Hz – 5 kHz) rispetto alla simulazione; l'errore percentuale risulterebbe quindi minore rispetto al caso delle PCB interne anche in virtù del fatto che per il test delle PCB esterne è stato usato un segnale di ampiezza più alta (5 mV anziché 100  $\mu$ V). Vanno inoltre considerate sia le tolleranze inevitabili dei componenti sia le non idealità delle simulazioni.

Riguardo al rumore dello stadio di amplificazione e filtraggio i valori di Input Referred Noise delle schede esterne sono risultati minori dei valori di Output Referred Noise di quelle interne e dunque il rumore in ingresso allo stadio di amplificazione risulta maggiore di quello che loro stesse introducono. Va comunque specificato che il vincolo di noise non è stringente come nel caso del primo stadio di amplificazione in virtù della minore amplificazione rispetto al primo stadio.

I valori di cross-talk sono comparabili a quelli misurati con ingresso a massa; da ciò è deducibile che l'effetto della sinusoide nel canale adiacente è estremamente limitato.

I valori misurati di Input e Output Referred Noise sono confrontabili con quelli trovati in letteratura riguardo lo sviluppo di PCB per l'amplificazione di segnali neuronali realizzate

con componenti discreti [Rolston et al., 2009] ed inferiori rispetto alle soluzioni circuitali che sfruttano componenti CMOS [Olsson et al., 2005].

La fase sperimentale della tesi ha permesso di valutare il comportamento delle schede di pre-amplificazione connesse a colture neuronali cresciute su MEA. Attraverso le registrazioni effettuate tramite il set-up custom (Capitolo 4) si è potuta sostenere sia l'adeguatezza dell'elettronica di pre-amplificazione nel rilevare segnali neuronali sia la validità della camera di controllo ambientale nel ricreare un adeguato ambiente fisiologico per le colture.

Il primo aspetto è stato verificato dal confronto tra sistema commerciale e sistema custom nell'arco registrazioni di breve durata da MEA, onde evitare che le variazioni dei fattori ambientali (temperatura, umidità e percentuale di CO<sub>2</sub> gassosa) potessero inficiare i risultati. Infatti, il confronto effettuato ha mostrato la comparabilità della forma d'onda del segnale (tipicamente bifasica nei segnali neuronali), della frequenza media di sparo e del SNR. Questi due ultimi parametri erano, prima dell'implementazione dell'elettronica custom, inferiori al set-up commerciale [Biffi et al., 2012].

Il secondo aspetto è stato invece verificato valutando l'andamento temporale dell'attività di rete di una coltura posta all'interno della camera di controllo ambientale e monitorata per 4 ore consecutive. La frequenza di sparo è rimasta stabile per tutta la durata dell'esperimento, il che indica che la rete non ha subito un declino di vitalità grazie alla stabilità ambientale. Il valore di frequenza, inoltre, è risultato comparabile a quello rilevato da registrazioni più brevi riportate in letteratura, supportando ancora una volta la tesi che le colture non subiscono degradazioni [Gavello et al., 2012; Boehler et al., 2012].

I prototipi di PCB sviluppati e validati possono essere ritenuti adeguati per essere accoppiati alla camera di controllo ambientale e permettere quindi studi sia a breve che a lungo termine.

Una nota finale da tenere in considerazione è che lo sviluppo di un'elettronica custom ha permesso di produrre un circuito di amplificazione e filtraggio a costi nettamente inferiori a quelli presenti nel panorama commerciale; infatti, è stato possibile far produrre il primo prototipo di PCB di pre-amplificazione e filtraggio per un MEA a 60 canali sostenendo una spesa intorno ai 2000 Euro, ben inferiore rispetto ai costi dei front-end commerciali per

MEA (MultiChannel Systems, Panasonic, Plexon). Una produzione a maggior scala (cioè una replica del front-end per registrare simultaneamente da più MEA) abatterà ulteriormente i costi.

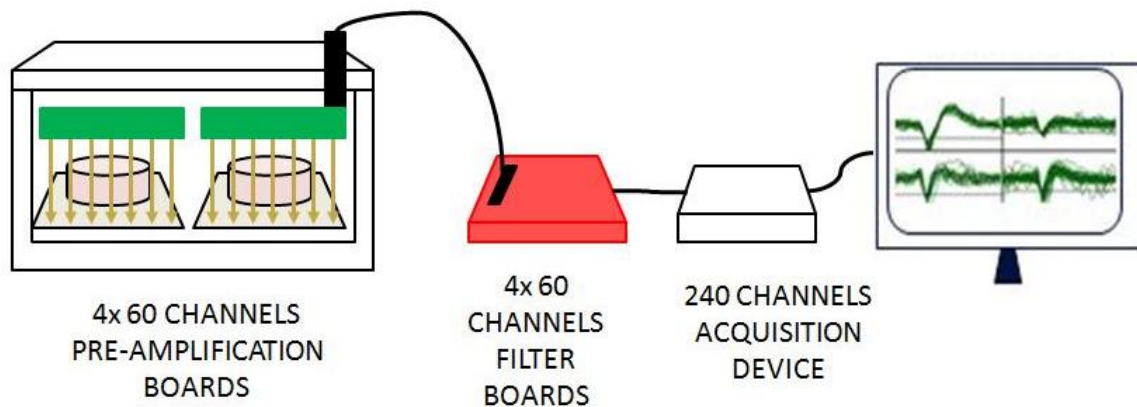
### 5.2 Sviluppi futuri

Possibili sviluppi futuri riguardanti il front-end analogico prevedono innanzitutto i test dell'intera elettronica collegata insieme; ovvero schede esterne in cascata a quelle interne sia con che senza colture neuronali.

Dovrà inoltre essere validata la compatibilità ambientale delle schede interne: trovandosi in un ambiente umido e a temperatura fisiologica (37 °C) bisognerà assicurare che le schede non vadano incontro a degradazioni; in commercio esistono numerosi prodotti utili per la protezione (i.e. silicone) ma non tutti risultano biocompatibili. Inoltre bisognerà verificare la compatibilità elettromagnetica (sia per le schede interne che quelle esterne) onde evitare che possibili disturbi esterni provochino anomalie nelle registrazioni.

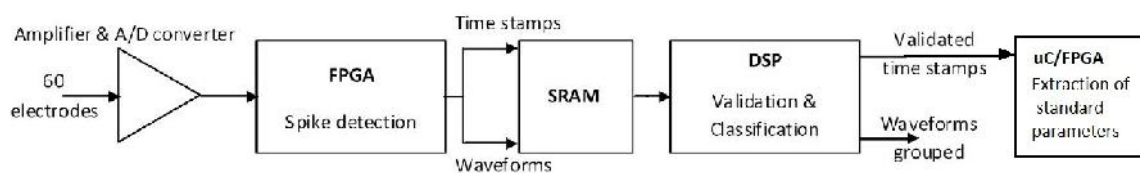
Andranno infine sviluppate ulteriori schede, sia interne che esterne, per consentire registrazioni di più colture in parallelo e migliorare dunque il throughput degli esperimenti (Figura 5.1). Registrare più colture in parallelo permetterebbe di risparmiare tempo e ottenere dati confrontabili di diverse colture a parità di condizioni ambientali. Quindi moltiplicando per 4 l'attuale numero di schede interne e esterne si arriverebbe a sfruttare appieno l'attuale camera ambientale. Servirà ovviamente un ADC in grado di digitalizzare il maggior numero di canali (i.e. MCS).

Data l'enorme mole di dati (tanti MEA in parallelo e registrazioni lunghe), una volta digitalizzato il segnale sarebbe efficiente svolgere gli algoritmi di analisi dei segnali in real-time, tramite algoritmi implementati via hardware. Si potrebbe così riconoscere gli spike e classificarli durante il corso degli esperimenti, dando un feed back immediato agli sperimentatori ed evitando il tempo richiesto per le analisi offline. Un possibile schema per ottenere questo scopo è riportato in figura 5.2. Tale implementazione potrebbe essere eseguita mediante l'uso di FPGA per la detezione dei potenziali d'azione; tramite DSP (Digital Signal Processor) sarebbe invece possibile suddividere i segnali tramite classificazione gerarchica in vari cluster a seconda della morfologia [Biffi et al., 2010] e poi estrarre dei parametri di rete.



**Figura 5.1.** Possibile futuro sviluppo dell'hardware di registrazione. A partire da sinistra: l'attuale camera a 4 camere con le relative schede di pre-amplificazione, il successivo stadio di amplificazione custom per 4x60 canali, una scheda di conversione analogico/digitale per 4x60 canali e il PC per la visualizzazione e registrazione dei segnali.

Questo sistema può trovare utilizzo per la valutazione dell'effetto di trattamenti farmacologici cronici sull'attività bioelettrica delle colture [Morefield et al., 2000; Howell et al., 2011] e in particolare sulla correlazione tra l'utilizzo di farmaci e neurotossicità [Scelfo et al., 2012]. Infatti risulterebbe ideale per valutare gli effetti sull'attività elettrica e quindi sulla vitalità cellulare delle colture per lunghi periodi di tempo. Inoltre sarebbe possibile approfondire studi riguardanti la modulazione dell'attività elettrica durante lo sviluppo e la plasticità neuronale [Hofman et al., 2006; Li et al., 2007; Bakkum etl., 2008].



**Figura 5.2.** Schema di un'ipotetica architettura hardware in grado di gestire autonomamente l'elaborazione dei segnali provenienti da una coltura neuronale. A partire da sinistra: sistema di amplificazione e filtraggio dei segnali provenienti dai 60 elettrodi, FPGA programmata per la spike detection, la SRAM per la memorizzazione delle forme d'onda e i time stamps, il DSP per il riconoscimento degli spike e infine un microcontrollore o FPGA per l'estrazione dei parametri di interesse [Biffi et al., 2010].

# Bibliografia

- Bai, Q., & Wise, K. (2001). Single-unit neural recording with active microelectrode arrays. *IEEE Trans Biomed Eng*, 48, 911-920.
- Bakkum, D.J., Chao, Z.C., & Potter, S.M. (2008). Long-term activity-dependent plasticity of action potential propagation delay and amplitude in cortical networks. *PLoS One*, 3(5), e2088.
- Beggs JM, Plenz D. (2003). Neuronal avalanches in neocortical circuits. *J Neurosci*. 3(35):11167-77
- Biffi, E., Ghezzi, D., Pedrocchi, A., & Ferrigno, G. (2010). Development and validation of a spike detection and classification algorithm aimed at implementation on hardware devices. *Comput Intell Neurosci*, 659050.
- Biffi, E., Menegon, A., Piraino, F., Pedrocchi, A., Fiore, G.B., & Rasponi, M. (2011). Validation of long-term primary neuronal cultures and network activity through the integration of reversibly bonded microbioreactors and MEA substrates. *Biotechnol Bioeng*.
- Biffi E, Regalia G, Ghezzi D, De Ceglia R, Menegon A, Ferrigno G, Fiore GB, Pedrocchi A. (2012) A novel environmental chamber for neuronal network multisite recordings. *Biotechnol Bioeng*.
- Blau, A., & Ziegler, C. (2001). Prototype of a novel autonomous perfusion chamber for long-term culturing and in situ investigation of various cell types. *J Biochem Biophys Methods*, 50, 15-27.
- Boehler MD, Leondopulos SS, Wheeler BC, Brewer GJ. (2012) Hippocampal networks on reliable patterned substrates. *J Neurosci Methods*. 203(2):344-53.
- Borghi T., Bonfanti, A., Zambra, G., Gusmeroli, R., Lacaita, A.L., Spinelli, A.S., & Baranauskas, G. (2007). An integrated low-noise multichannel system for neural signals amplification., (p.456-459).
- Charvet, G., Rousseau, L., Billoint, O., Gharbi, S., Rostaing, J., Joucla, S., Trevisiol, M., Bourerette, A., Chauvet, P., Moulin, C., Goy, F., Mercier, B., Colin, M., Spirkovitch, S., Faner, H., Meyrand, P., Guillemaud, R., Yvert, B. (2010). BioMEA™: A versatile high-density 3D microelectrode array system using integrated electronics. *Biosens Bioelectron*, 25, 1889-1896.
- Chiappalone, M., Bove, M., Vato, A., Tedesco, M., & Martinoia, S. (2006). Dissociated cortical networks show spontaneously correlated activity patterns during in vitro development. *Brain Res*, 1093, 41-53.
- Chiappalone, M., Massobrio, P., & Martinoia, S. (2008). Network plasticity in cortical assemblies. *Eur J*

*Neurosci*, 28,221-237.

Chiappalone, M., Novellino, A., Vato, A., Martinoia, S., Vajda, I., Van Pelt, J. (2004). Analysis of the bursting behavior in developing neural networks. *2<sup>nd</sup> Int Symposium on Measurement, Analysis and Modeling of Human Functions*.

Chiappalone, M., Vato, A., Berdondini, L., Koudelka-Hep, M., & Martinoia, S. (2007). Network dynamics and synchronous activity in cultured cortical neurons. *Int J Neural Syst*, 17, 87-103.

Eytan, D., Brenner, N., & Marom, S. (2003). Selective adaptation in networks of cortical neurons. *J Neurosci*, 23 (28), 9349-9356.

Faingold, C.L. (2004). Emergent properties of CNS neuronal networks as targets for pharmacology: Application to anticonvulsant drug action. *Prog Neurobiol*, 72 (1), 55-85.

Frey, U., Egert, U., Heer, F., Hafizovic, S., Hierlemann, A. (2007). Microelectronic system for high-resolution mapping of electric fields applied to brain slices. *Biosens Bioelectron*, 24, 2191-2198

Gavello D, Rojo-Ruiz J, Marcantoni A, Franchino C, Carbone E, Carabelli V. (2012) Leptin counteracts the hypoxia-induced inhibition of spontaneously firing hippocampal neurons: a microelectrode array study. *PLoS One*

Gramowski, A., Jügelt, K., Weiss, D.G., & Gross, G.W. (2004). Substance identification by quantitative characterization of oscillatory activity in murine spinal cord networks on microelectrode arrays. *Eur J Neurosci*, 19 (10), 2815-2825.

Gray, S. A., Kusel, J. K., Shaffer, K.M., Shubin, Y.S., Stenger, D.A., & Pancrazio, J. J. (2001). Design and demonstration of an automated cell-based biosensor. *Biosens Bioelectron*, 16(7-8), 535-542.

Gross, G.W. (1979). Simultaneous single unit recording in vitro with a photoetched laser deinsulated gold multimicroelectrode surface. *IEEE Trans Biomed Eng*, 26 (5), 273-279.

Gross, G.W., Harsch, A., Rhoades, B.K., & Göpel, W. (1997). Odor, drug and toxin analysis with neuronal networks in vitro: extracellular array recording of network responses. *Biosens Bioelectron*, 12(5), 373-393.

Gross, G., & Schwalm, F. (1994). A closed flow chamber for long-term multichannel recording and optical monitoring. *J Neurosci Methods*, 52, 73-85.

Hakkoum, D., Stoppini, L., & Müller, D. (2007). Interleukin-6 promotes sprouting and functional recovery in lesioned organotypic hippocampal slice cultures. *J Neurochem*, 100(3), 747-757.

Hales, C., Rolston, J., & Potter, S. (2010). How to culture, record and stimulate neuronal networks on microelectrode arrays (MEAs). *J Vis Exp*.

Howell, K. R., Kutiyawalla, A., & Pillai, A. (2011). Long-term continuous corticosterone treatment



decreases VEGF receptor-2 expression in frontal cortex. *PLoSOne*, 6(5),e20198.

Johnstone, A., Gross, G., Weiss, D., Schroeder, O., Gramowski, A., & Shafer, T. (2010). Microelectrode arrays: a physiologically based neurotoxicity testing platform for the 21st century. *Neurotoxicology*, 31, 331-350.

Jones, I.L., Livi, P., Lewandowska, M.K., Fiscella, M., Roscic, B., & Hierlemann, A. (2011). The potential of microelectrode arrays and microelectronics for biomedical research and diagnostics. *Anal Bioanal Chem*, 399(7), 2313-2329.

Maeda, E., Robinson, H.P., & Kawana, A. (1995). The mechanisms of generation and propagation of synchronized bursting in developing networks of cortical neurons. *J Neurosci*, 15 (10), 6834-6845.

Morefield, S., Keefer, E., & Gw, K. C. (2000). Drug evaluations using neuronal networks cultured on microelectrode arrays. *Biosens Bioelectron*, 15, 383-396.

Morin, F., Takamura, Y., & Tamiya, E. (2005). Investigating neuronal activity with planar microelectrode arrays: achievements and new perspectives. *J Biosci Bioeng*, 100, 131-143.

Mukai, J., Shiina, T., & Jimbo, Y. (2003). Continuous Monitoring of Developmental Activity Changes in Cultured Cortical Networks. *Electrical Engineering in Japan*, 145, 28-37.

O'Donovan, M.J. (1999). The origin of spontaneous activity in developing networks of the vertebrate nervous system. *Curr Opin Neurobiol*, 9(1), 94-104.

Obeid, I., Nicoletis, M.A.L., Wolf, P. (2004). A low power multichannel analog front end for portable neural signal recordings. *J Neurosci. Methods*, 133, 27-32.

Pancrazio, J., Gray, S., Shubin, Y., Kulagina, N., Cuttino, D., Shaffer, K., Eisemann, K., Curran, A., Zim, B., Gross, G. W., & O'Shaughnessy, T.J. (2003). A portable microelectrode array recording system incorporating cultured neuronal networks for neurotoxin detection. *Biosens Bioelectron*, 18, 1339-1347.

Pelt, J.v., Wolters, P., Corner, M., Rutten, W., & Ramakers, G. (2004). Long-term characterization of firing dynamics of spontaneous bursts in cultured neural networks. *IEEE Trans Biomed Eng*, 51, 2051-2062.

Potter, S.M. (2001). Distributed processing in cultured neuronal networks. *Prog Brain Res*, 130, 49-62.

Potter, S., & De Marse, T. (2001). A new approach to neural cell culture for long-term studies. *J Neurosci Methods*, 110, 17-24.

Regalia G., 2011. Progettazione del front end integrato e validazione sperimentale di una camera di coltura per lo studio a lungo termine dell'attività bioelettrica di neuroni in vitro MD thesis. Politecnico di Milano. Italy

- Regalia, G., Biffi, E., Menegon, A., Ferrigno, G., Pedrocchi, A. (2012) A recording setup for long-term monitoring of in vitro neuronal networks on Microelectrode Arrays, Proceedings of MEA Meeting 2012, Reutlingen, Germany
- Rolston, J.D., Gross, R.E., Potter, S.M. (2009). A low-cost multielectrode system for data acquisition enabling real-time closed-loop processing with rapid recovery from stimulation artifact. *Front Neuroeng*. doi: 10.3389/neuro.16.012.2009
- Scelfo B., Politi, M., Reniero, F., Palosaari, T., Whelan, M., Zaldivar, J.M. Application of multielectrode array (MEA) chips for the evaluation of mixtures neurotoxicity *Toxicology*, 299, 172-183
- Shahaf, G., & Marom, S. (2001). Learning in networks of cortical neurons. *J Neurosci*, 21, 8782-8788.
- Shimono, K., Baudry, M., Ho, L., Taketani, M., & Lynch, G. (2002). Long-term recording of LTP in cultured Hippocampal slices. *Neural Plast*, 9(4), 249-254.
- Slocum, H., Parsons, J., Winslow, E., Broderick, L., Minderman, H., Tóth, K., Greco, W. R., & Rustum, Y. M. (2000). Time-lapse videoreveals immediate heterogeneity and heritable damage among human ileocecal carcinoma HCT-8 cell treated with raltitrexed (ZD1694). *Cytometry*, 41, 252-260.
- Stett, A., Egert, U., Guenther, E., Hofmann, F., Meyer, T., Nisch, W., & Haemmerle, H. (2003). Biological application of microelectrode arrays in drug discovery and basic research. *Anal Bioanal Chem*, 377(3), 486-495.
- Wagenaar, D. A., Pine, J., & Potter, S. M. (2006). An extremely rich repertoire of burst patterns during the development of cortical cultures. *BMC Neurosci*, 7, 11.
- Wrobel, G., Zhang, Y., Krause, H.-J., Wolters, N., Sommerhage, F., Offenhäusser, A., & Ingebrandt, S. (2006). Influence of the first amplifier stage in MEA systems on extracellular signal shapes. *Biosens Bioelectron*, 22(6), 1092-1096.
- Xiang, G., Pan, L., Huang, L., Yu, Z., Song, X., Cheng, J., Xing, W., & Zhou, Y. (2007). Microelectrode array-based system for neuropharmacological applications with cortical neurons cultured in vitro. *Biosens Bioelectron*, 22(11), 2478-2484.

### Data Sheet

MEA10-60 datasheet:

[http://www.multichannelsystems.com/uploads/tx\\_ttproducts/datasheet/MEA1060\\_02.pdf](http://www.multichannelsystems.com/uploads/tx_ttproducts/datasheet/MEA1060_02.pdf)

MCS cabled datasheet: [http://www.okidensen.co.jp/en/prod/cable/tashin/saikei\\_io\\_cable.html](http://www.okidensen.co.jp/en/prod/cable/tashin/saikei_io_cable.html)

PGA64 datasheet: [http://www.multichannelsystems.com/uploads/tx\\_ttproducts/datasheet/PGA.pdf](http://www.multichannelsystems.com/uploads/tx_ttproducts/datasheet/PGA.pdf)

NI USB-6009 datasheet: <http://sine.ni.com/nips/cds/print/p/lang/it/nid/201987>