

ALMA MATER STUDIORUM - UNIVERSITÀ DI BOLOGNA

CAMPUS DI CESENA

Corso di Laurea in Ingegneria Biomedica

Visualizzazione automatizzata in tempo reale di
colture cellulari in incubatore da laboratorio

Elaborato in

Biochimica

Relatore

Prof. Ing. Emanuele Giordano

Presentato da

Matteo Balzani

Anno Accademico 2018-2019

Indice

Sommario

Introduzione	1
CAPITOLO 1: La coltura cellulare	2
1.1 Storia delle colture cellulari.....	2
1.2 Vantaggi e svantaggi dell'utilizzo di colture cellulari.....	3
1.3 Colture primarie e colture stabilizzate	4
1.4 I diversi tipi di cellule in coltura.....	4
1.5 Applicazioni delle colture cellulari <i>in vitro</i>	6
1.6 Applicazioni delle colture <i>in vitro</i> di cellule di mammifero	7
CAPITOLO 2: Presentazione del dispositivo Incu-Stream	10
2.1 Introduzione	10
2.2 Realizzazione dell'hardware di Incu-Stream	12
2.2.1 Il componente di visualizzazione	12
2.2.2 Il movimento del componente di visualizzazione	14
2.2.3 Il microcontrollore e la realizzazione del circuito di controllo	15
2.2.4 La progettazione del contenitore del dispositivo	17
2.2.5 Il supporto per la piastra	18
2.2.6 L'illuminazione a LED	19
2.3 Presentazione del microcontrollore e della programmazione dell'interfaccia operatore.....	19
2.3.1 Diagrammi di flusso e funzioni	19
2.3.2 I messaggi e il controllo del dispositivo di visualizzazione	21
2.3.3 Il movimento verso una cella specifica.....	22
2.3.4 La ricerca ottimale della posizione e la messa a fuoco	23
2.3.5 Configurazione della sottogriglia.....	24
2.3.6 Il controllo del movimento nella sottogriglia	24
2.3.7 La durata di acquisizione della sottogriglia	25
2.3.8 La programmazione dell'interfaccia operatore.....	26
2.3.9 La Calibrazione della scala dell'immagine	28
2.3.10 L'ingrandimento e la risoluzione	29
2.4 Test e validazione del dispositivo	29
3 – Conclusioni.....	32
Ringraziamenti.....	34
Bibliografia.....	35

Introduzione

Le piastre per microtitolazione sono strumenti da laboratorio che hanno un numero specifico di celle, utilizzate come piccole provette negli studi di coltura cellulare.

Nella maggior parte dei laboratori di coltura cellulare che hanno poco budget a disposizione, l'operatore deve determinare microscopici cambiamenti nella cella della piastra portando fuori dall'incubatore la piastra e osservando ogni cella al microscopio, con il rischio di contaminazione e perdita di affidabilità.

Una soluzione alternativa è quella di utilizzare dei dispositivi che osservino le celle all'interno dell'incubatore, ma quelli attualmente in commercio non hanno prezzi accessibili per molti laboratori.

In questo elaborato verrà presentato quindi un dispositivo a basso costo progettato, realizzato e infine testato all'interno di un incubatore, ideato per risolvere il problema della contaminazione che le colture cellulari possono subire durante la manipolazione da parte del personale.

Questo sistema, sviluppato dai ricercatori Güray Gürkan e Koray Gürkan, permette di osservare in tempo reale all'interno dell'incubatore ogni tipologia di piastra per microtitolazione scelta dall'operatore: può infatti catturare immagini in microscopia ottica a campo chiaro, utilizzando un sensore di immagine CMOS economico, un obiettivo CCTV varifocale invertito e una serie di LED.

In aggiunta, avendo sviluppato degli algoritmi di potenziamento dell'immagine e di movimentazione su due assi, l'intera area di una cella selezionata dall'operatore (ad esempio, un'area di 6.5 mm di diametro in una piastra da 96 celle) può essere automaticamente ripresa senza dover utilizzare software di terze parti.

La performance del sistema sul lungo periodo è stata testata in incubatori con linee cellulari di rene embrionale umano e carcinoma mammario.

CAPITOLO 1: La coltura cellulare

1.1 Storia delle colture cellulari

I primi studi riguardanti l'ambiente cellulare risalgono agli inizi del XX secolo, quando numerosi ricercatori tentarono di isolare cellule dagli organismi e di mantenere in coltura frammenti di tessuto vitali, riuscendo ad effettuare i primi esperimenti. Le prime colture *in vitro* documentate di questi anni sono quelle di frammenti di tessuto di rana (Harrison, 1907) e di tessuto linfatico di crostacei (Fischer-Piette, 1929), animali scelti appositamente a sangue freddo perché non necessitavano di temperature diverse da quella ambientale. Il passo successivo nel miglioramento di queste tecniche si ebbe però solo nel 1943, quando Earle riuscì ad ottenere le prime linee continue di cellule di mammifero. Nel 1952 venne mantenuta in coltura la prima linea tumorale di origine umana (cellule HeLa) (Scherer et al., 1953).

Grazie allo sviluppo delle tecnologie, delle tecniche di sterilità e della formulazione dei terreni di coltura, le colture cellulari hanno avuto un rapido sviluppo, contribuendo in modo significativo nei campi della biologia e della medicina, permettendo una comprensione migliore dei meccanismi cellulari e molecolari e dunque un minore ricorso alla sperimentazione *in vivo*.

Oggi sono disponibili una buona varietà e quantità di linee cellulari stabilizzate, contenute all'interno di vere e proprie "banche cellulari", derivate da numerose specie diverse, le cui caratteristiche morfologiche, di crescita, genetiche e la cui sensibilità sono ben note; grazie a questi fattori si è riuscita ad ottenere una standardizzazione e un corretto uso dal punto di vista della validazione, in quanto le colture vengono stabilizzate, studiate e mantenute. Una buona parte di linee cellulari sono di mammiferi, e numerose sono quelle di origine umana, comprendendo cellule normali e cellule tumorali. Tramite l'utilizzo di queste cellule è possibile riconoscere molti aspetti della biologia cellulare, compresa quella delle cellule trasformate. In campo eco-tossicologico sono impiegate colture di cellule provenienti da uccelli, pesci e alghe per valutare dati su inquinanti ambientali (ad esempio pesticidi) e della veicolazione di quest'ultimi attraverso le catene alimentari.

1.2 Vantaggi e svantaggi dell'utilizzo di colture cellulari

Il più grande vantaggio che si ottiene utilizzando colture cellulari è la possibilità di analizzare gli effetti tossici su cellule umane, interpretando i risultati ottenuti *in vitro* da queste cellule con quelli da cellule animali, e i dati *in vivo* ottenuti sugli animali. Inoltre, il costo degli esperimenti ottenuti in colture cellulari è notevolmente più basso rispetto ai test *in vivo*, fornendo risultati in tempi brevi con l'utilizzo di basse concentrazioni delle sostanze da saggiare.

Il grande limite è la sostanziale differenza tra lo studiare un sistema di cellule isolate e un organismo intero, quest'ultimo dotato di maggiore complessità e comprendente le interazioni specifiche cellula-cellula e le caratteristiche istologiche del tessuto di origine.

Un altro aspetto da valutare è la preparazione del personale che dovrà osservare e manipolare le colture, in quanto necessitano di sterilità assoluta. Il personale dovrà essere sempre attento a non incorrere in una contaminazione da batteri, muffe o lieviti che causerà la perdita della coltura stessa.



Figura 1 – Attrezzatura da laboratorio

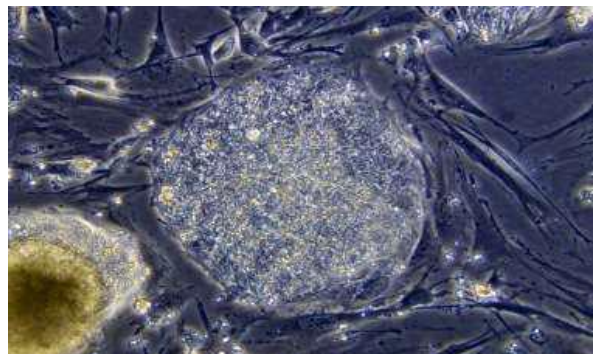


Figura 2 – Cellula embrionale



Figura 3 - Terreni liquidi per colture cellulari

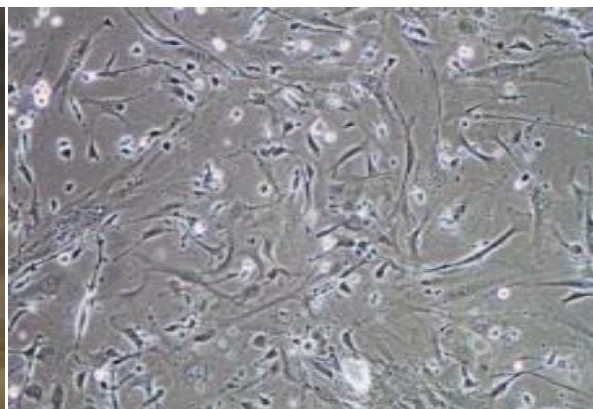


Figura 4 – Cellule endoteliali

1.3 Colture primarie e colture stabilizzate

Una coltura cellulare deriva dalle cellule provenienti da un organo o da un tessuto. Queste cellule vengono depositate in bottiglie, capsule o fiasche di coltura contenenti un apposito liquido (terreno di coltura) o semiliquido (gel) e aderiscono alla superficie del recipiente: solo in questo modo è possibile la loro sopravvivenza e proliferazione. Con il tempo, le cellule occupano tutto lo spazio disponibile, costituendo un unico strato, da cui il nome di “coltura in monostrato”.

Le cellule derivanti dal tessuto di origine definiscono la coltura primaria, e queste cellule hanno affinità con il tessuto originario ma hanno una crescita e sopravvivenza limitate. Una coltura cellulare stabilizzata invece si ha invece quando è possibile mantenere e far crescere indefinitamente le cellule in coltura.

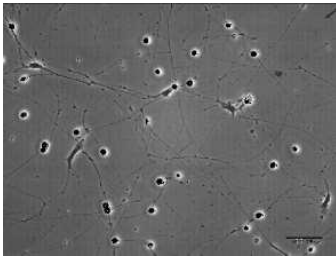


Figura 5 - Neuroni

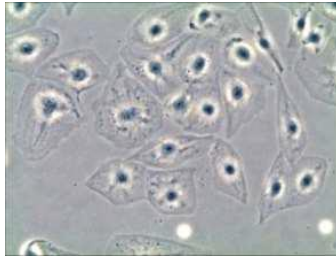


Figura 6 - Cellule endoteliali

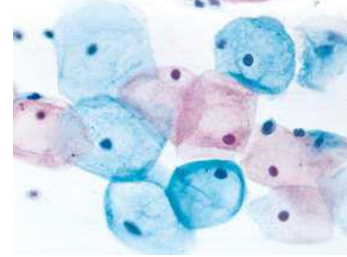


Figura 7 – Cellule cervice uterina

1.4 I diversi tipi di cellule in coltura

Possiamo distinguere ulteriormente le diverse tipologie di cellule in coltura:

- **Colture a breve e a lungo termine:** le prime muoiono poco dopo essersi riprodotte, mentre le seconde si dividono moltissime volte, quasi illimitatamente
- **Colture in monostrato:** le cellule epiteliali e connettivali di molti tessuti aderiscono alla superficie del contenitore e la loro adesione è necessaria alla sopravvivenza e proliferazione, e finiscono con l'occupare tutto lo spazio disponibile formando un monostrato
- **Colture in sospensione:** non aderiscono necessariamente al supporto, ne sono un esempio le cellule ematopoietiche e quelle tumorali. Queste cellule, non

aderendo alla superficie di coltura, non danno un segnale chiaro del raggiungimento della densità massima, perciò è necessario contare le cellule

- **Colture massive:** sono cellule di varia origine che sono utilizzate in grande quantità ($>10^9$) per produrre, ad esempio, vaccini
- **Colture clonali:** sono colture derivanti dalla riproduzione di cellule inizialmente diluite nel contenitore, generando ognuna una colonia o clone
- **Co-culture:** colture di cellule diverse coltivate nello stesso contenitore, utilizzate per simulare un tessuto
- **Colture istotipiche:** simulano la tridimensionalità in quanto, utilizzando supporti di cellulosa o policarbonato, le cellule si organizzano come in un tessuto

A causa dell'accorciamento dei telomeri, esiste un limite al numero di divisioni cellulari: questo fu determinato per la prima volta da Leonard Hayflick. Le sue osservazioni lo portarono a ipotizzare un preciso numero massimo di mitosi cellulare, chiamato appunto *limite di Hayflick*.

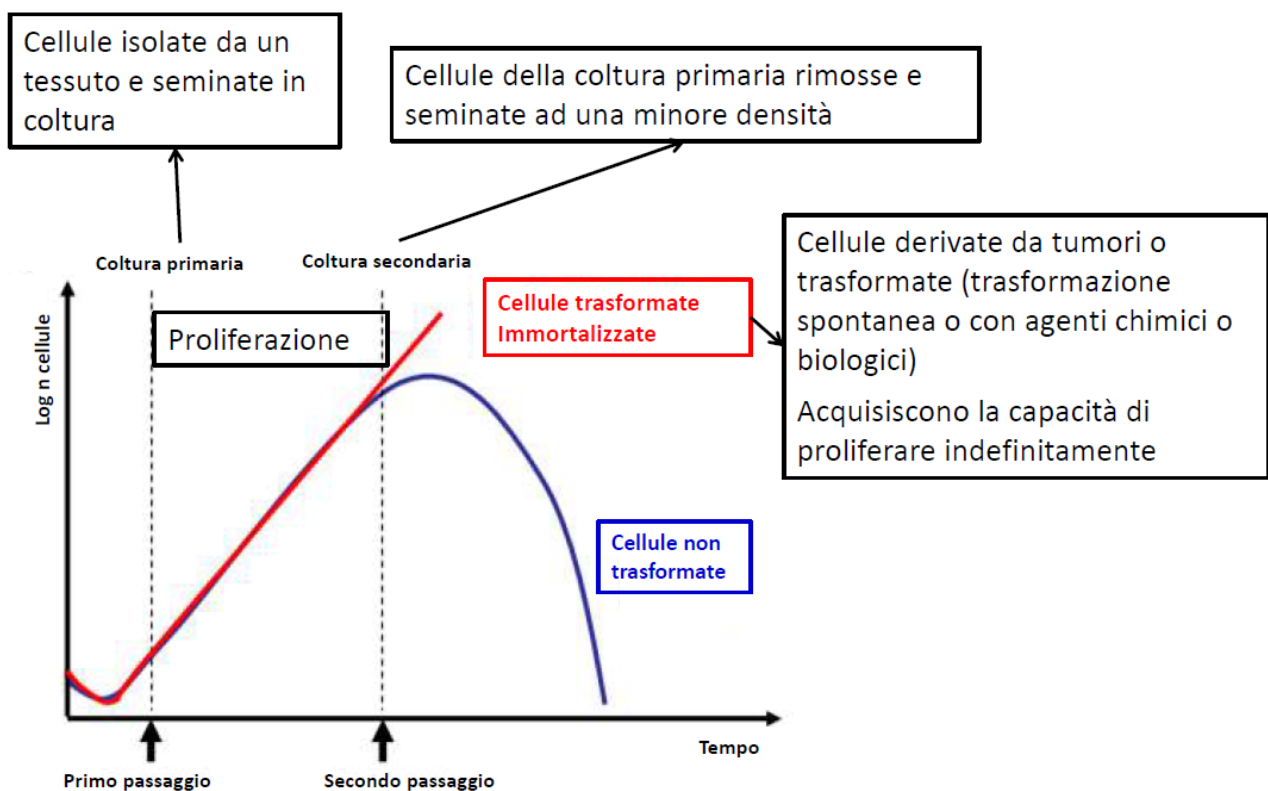


Figura 8 - Grafico del limite di Hayflick

Tutte le tipologie di colture cellulari necessitano di assoluta sterilità, in quanto al contrario si avrebbe un decadimento, determinato dall'inquinamento da micoplasmi, batteri, muffe o lieviti.

Per ottenere la totale assenza di microrganismi inquinanti è necessario

- Trattare i materiali con autoclavi e stufe
- Irraggiare (UV) le superfici
- Ultrafiltrazione dei liquidi
- Utilizzare disinfettanti
- Aggiungere antibiotici nei terreni
- Manipolare in atmosfera sterile (accanto a cappe a flusso laminare)
- Utilizzare incubatori
- Uso di materiali monouso sterili

La contaminazione può avvenire per diverse cause:

- **Ambientale:** Stanze per colture cellulari che non seguono la norma e/o non sono dotate di attrezzature adeguate (cappe sterili a flusso laminare, congelatori a -80° , contenitori criogenici a $-196^{\circ}\text{C}..$). Le superfici devono essere pulite e non si possono portare oggetti fuori dalla stanza colture.
- **Operatore:** Deve conoscere le procedure e le tecniche per ridurre il rischio di contaminare le colture (cappe a flusso laminare, dispositivi di protezione individuale)
- **Colture:** sono frequenti le contaminazioni da funghi, lieviti e micoplasmi che possono distruggere le colture o alterare le caratteristiche delle cellule

Altri requisiti sono il controllo della temperatura (ad esempio le cellule di mammifero necessitano di circa 37°) e quello del pH, quest'ultimo ottenuto mantenendo una adeguata concentrazione di CO_2 .

1.5 Applicazioni delle colture cellulari *in vitro*

Le principali verifiche che gli operatori eseguono sulle colture cellulari sono quelle di vitalità, respirazione, replicazione e permeabilità di membrana. Inoltre, tramite l'utilizzo di cellule specializzate, sono possibili studi più specifici riguardanti la

funzionalità di enzimi, recettori di membrana e proteine che hanno un ruolo nei processi di tossicità.

Il grande sviluppo della tecnologia delle colture cellulari, ha portato il loro utilizzo in molti campi della ricerca, dalla biologia molecolare alla medicina, fino ad arrivare alla biotecnologia.

Le tipologie di cellule coltivabili sono numerose e derivano da diversi tessuti e specie vegetali o animali, ed è per questo che esistono vari tipi di coltura.

Esistono poi molte banche di cellule stabilizzate e con l'assenza di contaminazioni, tuttavia nell'impiego delle colture cellulari è bene tenere presenti alcune importanti definizioni fornite dall' European Tissue Culture:

- **Linea Cellulare:** ottenuta dalla coltura primaria dopo la prima subcoltura ed è costituita da diverse linee di cellule derivanti dalla coltura primaria: in questo caso le linee cellulari possono essere finite o continue
- **Ceppo cellulare:** derivante dalla coltura primaria o da una linea cellulare per selezione di cellule con particolari proprietà, con il mantenimento di queste nelle successive subcolture
- **Trasformazione in vitro:** cambiamento ereditabile delle cellule in coltura dovuto a eventi spontanei oppure indotto con virus o radiazioni ad esempio, con lo scopo di fare acquisire proprietà morfologiche, antigeniche e proliferative alterate.

1.6 Applicazioni delle colture *in vitro* di cellule di mammifero

Gli studi sulle colture cellulari si differenziano in studi di affidabilità e studi di pertinenza: i primi, tramite l'utilizzo di sostanze a tossicità nota, verificano la sensibilità e la specificità dei metodi utilizzati e l'attendibilità dei risultati. Sono utilizzati dunque per saggiare la riproducibilità e la standardizzazione dei metodi *in vitro*. Gli studi di pertinenza invece, trovano le corrispondenze tra i dati *ottenuti in vitro* e *in vivo* e i dati di questi due con la situazione naturale.

Le applicazioni principali delle colture cellulari sono:

- Screening a basso costo di sostanze potenzialmente tossiche, ottenuti utilizzando linee cellulari stabilizzate di semplice mantenimento. Questi screening valutano l'integrità strutturale e la funzionalità cellulare
- Studio dei meccanismi di tossicità che tengono conto di determinate funzioni o strutture cellulari
- Studi sul metabolismo e sulla biotrasformazione, utilizzando epatociti di diverse specie animali (pollo, ratto, topo, uomo)

Le applicazioni delle colture cellulari *in vitro*, grazie allo sviluppo delle tecniche di biologia molecolare e in particolare della tecnologia degli acidi nucleici, sono molteplici e si distinguono nei seguenti campi:

- Biologia cellulare, con il controllo della crescita, differenziamento, metabolismo
- Biologia molecolare, valutando l'espressione genica e la struttura del genoma
- Farmacologia e tossicologia
- Genetica, isolando e differenziando i mutanti
- Cariologia e citogenetica, con diagnosi cliniche e prenatali
- Oncologia, studiando i tumori e l'efficacia dei farmaci
- Produzione di proteine, anticorpi, ibridomi

CAPITOLO 2: Presentazione del dispositivo Incu-Stream

2.1 Introduzione

Nella realizzazione di protocolli per scoperta di nuovi farmaci, gli effetti dipendenti dalla dose e dal tempo degli agenti candidati (composti naturali, farmaci chemioterapici) devono essere analizzati in cellule di mammifero.

L'osservazione in tempo reale permette lo studio della dinamicità degli eventi cellulari, e le osservazioni sul lungo periodo sono possibili grazie all'utilizzo di un microscopio e di una telecamera che permetta di mantenere il funzionamento cellulare, ma che ne permetta anche l'osservazione tramite l'obiettivo del microscopio.

Per le analisi sulle dosi dei farmaci sono utilizzate spesso le piastre per microtitolazione, dove un certo numero di celle, separate tra loro, è trattato con diverse dosi.

Successivamente la piastra viene inserita all'interno di un incubatore che simula un ambiente con condizioni ambientali ideali, stabilizzando le percentuali di umidità (95%) temperatura (37°) e CO₂ (5%) come nel corpo umano.

Quando si vuole studiare l'effetto di diverse dosi di farmaco in una piastra con più celle, si devono analizzare gli effetti a lungo termine (12h, 24h, 96h etc.) e il personale del laboratorio deve necessariamente prendere la piastra dall'incubatore e osservare ogni cella al microscopio.

Questa osservazione manuale comporta il rischio di contaminazione e di degrado della coltura durante il test, ed è per questo che sono nati dei dispositivi per osservare automaticamente le celle, utilizzati sia nel campo della biologia molecolare ma anche in campo chimico e nei laboratori di diagnostica.

Sono disponibili diversi dispositivi in commercio ma hanno un costo troppo elevato per i piccoli laboratori, ed è per questo che sono stati studiati e implementati diversi sistemi di visualizzazione in microscopia low cost.

Ad esempio, è stato sviluppato [Parikesit et al.] un dispositivo di visualizzazione basato su una webcam, in altri studi invece i ricercatori hanno testato un apparecchio che prevedeva un microscopio senza lenti.

In questi due casi, è stata apprezzata la portabilità dei due sistemi, in quanto molto leggeri e a basso costo, tuttavia il fatto di non avere le lenti comportava il dover posizionare il microscopio a una distanza molto piccola dalla cella (<1mm), risultando dunque poco compatibili con i substrati delle colture cellulari come le piastre per microtitolazione e piastre di Petri.

Altri ricercatori [Kim et al.] hanno proposto un mini-microscopio basato su lenti invertite di una webcam, e per ottenere diversi ingrandimenti (8-60X) hanno utilizzato dei cilindri tagliati da tubi Eppendorf da posizionare alla distanza desiderata tra le lenti e il sensore CMOS della webcam.

Switz et al. invece hanno proposto un microscopio basato su lenti di uno smartphone, controllato manualmente in tre dimensioni.

Il sistema Incu-Stream presentato in questo elaborato è basato su un microscopio in campo chiaro che ha le seguenti specifiche:

- 1) Il dispositivo ha un hardware aperto e facilmente realizzabile tramite i riferimenti forniti dall'autore, come disegni CAD e schemi circuitali
- 2) I componenti hardware del sistema sono di tipo commerciale e ampiamente disponibili a basso costo
- 3) L'hardware prevede l'utilizzo di un microcontrollore con una piattaforma open-source (tipo Arduino)
- 4) Il software del sistema è di tipo open-source (quindi non deve prevedere l'acquisto di una licenza, come MATLAB) e ha una interfaccia grafica user-friendly
- 5) Il dispositivo è adatto per una osservazione in tempo reale e a lungo termine, all'interno di un incubatore
- 6) Ha un campo di visione costante ma possiede anche la possibilità di variarlo da remoto, per ogni cella e in ogni tipo diverso di piastra
- 7) Se richiesto, è in grado di scannerizzare e salvare l'immagine di una intera cella
- 8) La piastra per microtitolazione da visualizzare è saldamente collegata al dispositivo in maniera facile (come in sistemi commerciali di alta gamma)

Gli autori del progetto, ingegneri elettronici, hanno scelto componenti meccanici ed elettrici facili da trovare in commercio e a basso costo, proponendo il loro studio sulla rivista IEEE Access per avere un pubblico più ampio e cercare di creare una community che potesse riprodurre il loro sistema.

2.2 Realizzazione dell'hardware di Incu-Stram

L'hardware è responsabile della tenuta della piastra da visualizzare, fornire l'illuminazione necessaria ed abilitare il movimento coassiale delle lenti motorizzate e del sensore CMOS, movimento reso possibile tramite un motore brushless.

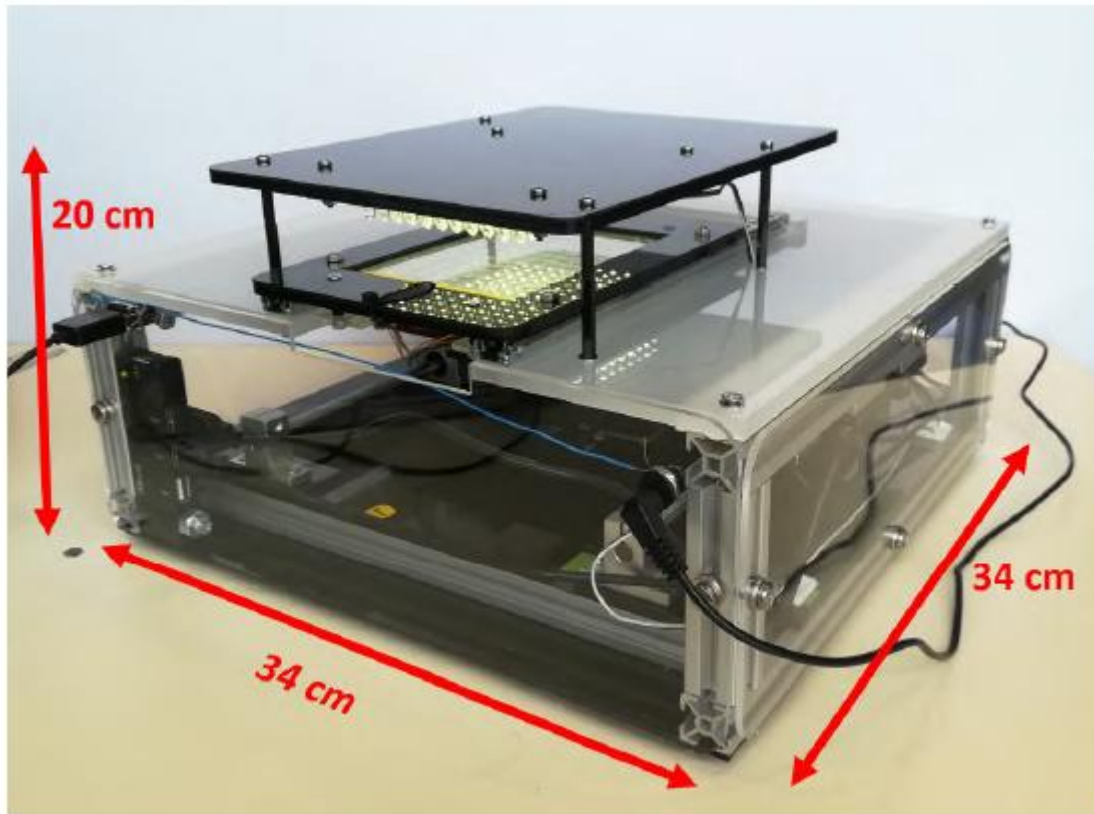


Figura 9 - Incu-Stream e dimensioni

2.2.1 Il componente di visualizzazione

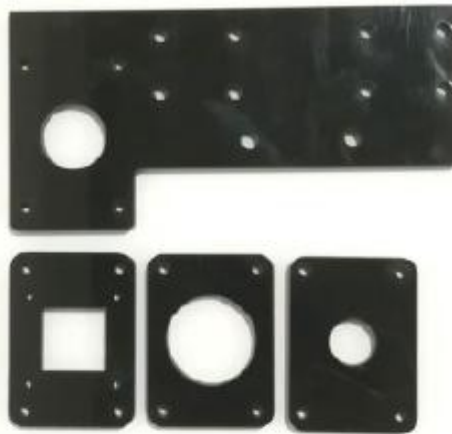
Il sistema di visualizzazione consiste in un sensore CMOS, una lente CCTV invertita, alcuni strati spessi 6mm in acrilico e dei distanziatori filettati.

I due ricercatori ideatori del progetto hanno voluto utilizzare una videocamera usb disponibile facilmente in commercio, dotata di una lente e un sensore CMOS di

dimensioni 5.37 x 4.04 mm. Il sensore possiede una risoluzione di 1920 X 1080 pixel, con ciascun pixel di dimensioni di 3 μ m.

Questo componente è in grado di generare file MJPEG a 30 fps con una risoluzione di 1920 X 1080 pixel.

Per quanto riguarda la lente CCTV, questa possiede due motori passo-passo per controllare l'ingrandimento e la messa a fuoco.



(a)



(b)



(c)



(d)

Figura 10 - Realizzazione del componente di visualizzazione. in a si vedono gli strati in acrilico progettati, in b è presente la lente motorizzata scelta dagli autori, in c viene mostrato l'asse X, in d c'è una vista laterale del componente

2.2.2 Il movimento del componente di visualizzazione

Per riuscire a visualizzare l'intera piastra, il movimento lungo i due assi deve coprire almeno una superficie di 8 cm X 12 cm, e fisicamente questo movimento sui due assi viene realizzato tramite un motore passo-passo con dei dadi di accompagnamento usati per convertire il movimento rotatorio in lineare.

La scheda scelta per interfacciarsi con il microcontrollore e i motori è una scheda ampiamente utilizzata in questo tipo di applicazioni, la DRV8825 con un chip interno della Texas Instrument.

Sono presenti i comandi di start, direzione e di passo, e pure l'alimentazione del motore è collegata alla scheda.

Per quanto riguarda invece il controllo della velocità, direzione e passi, questi vengono gestiti dal microcontrollore.

I due assi sono stati montati uno al di sopra dell'altro, in modo tale da far muovere l'asse X in maniera perpendicolare all'asse Y, e vi è la presenza di due contatti di finecorsa posizionati agli estremi come sicurezza.

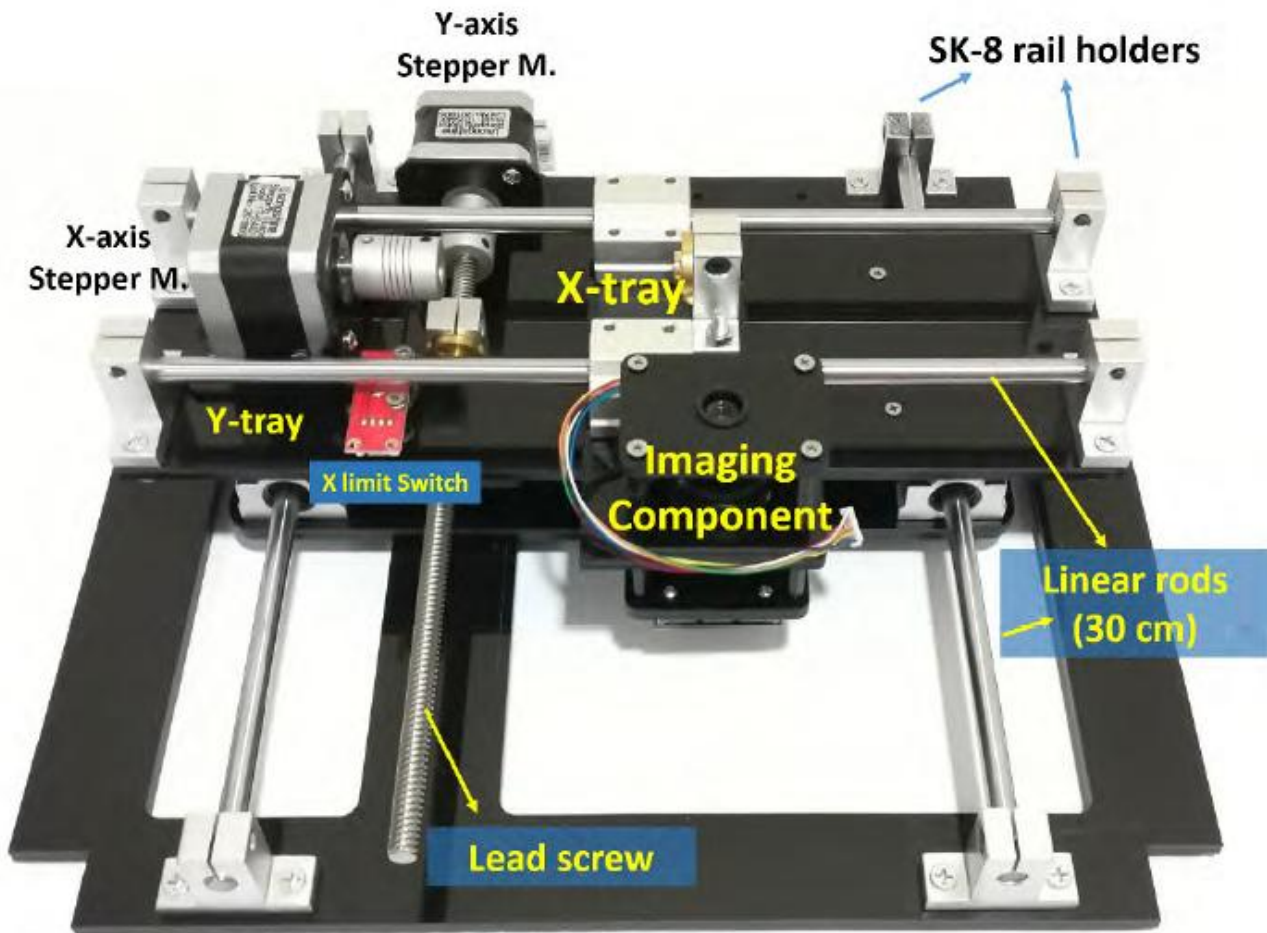


Figura 11 - Le parti costituenti del meccanismo di movimento. I contatti di finecorsa non sono visibili in quanto si trovano al di sotto dell'asse Y

2.2.3 Il microcontrollore e la realizzazione del circuito di controllo

Per poter gestire i motori, l'illuminazione a led e gli ingressi dei finecorsa è stato necessario utilizzare un microcontrollore, che permette anche di poter comunicare con il dispositivo di immagine tramite l'interfaccia operatore.

Per contenere i costi, è stato utilizzato un Arduino Nano contenente il microchip Atmega328P, programmabile in C grazie alla piattaforma di sviluppo di Arduino.

La circuiteria è stata disegnata e tradotta in un circuito stampato tramite un software commerciale, ed è stata dotata di tre uscite per comandare il motore, due contatti per gli ingressi dei finecorsa, due uscite per gestire l'illuminazione e l'alimentazione

esterna, un cicalino per gli avvisi, un condensatore di 2200 μ Farad per sopprimere segnali parassita.

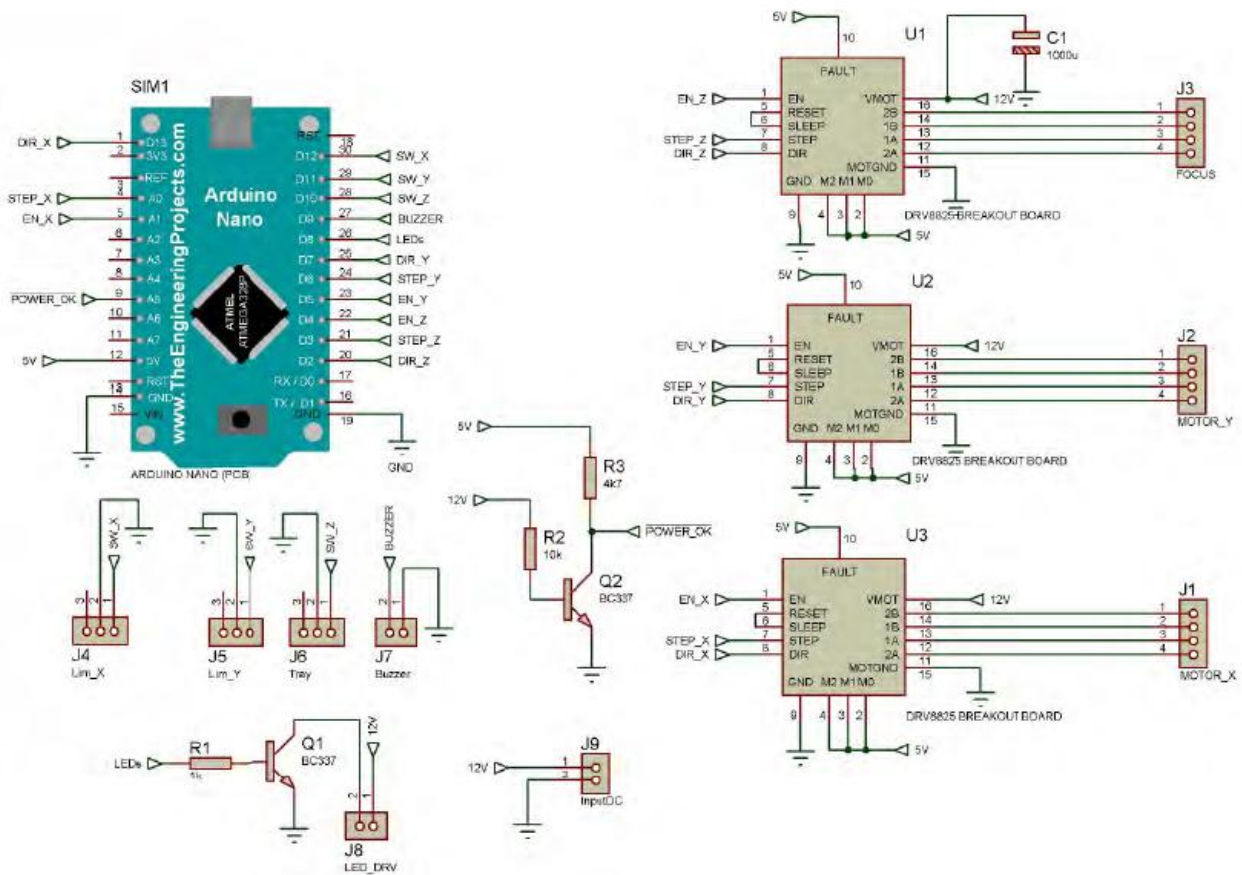


Figura 12 - Schema del circuito stampato

I motori passo-passo e gli azionamenti dei motori sono stati alimentati esternamente con +12 V/3 A, e lo stato di alimentazione attiva è stato dato in ingresso al pin A5 per poter essere gestito nel microcontrollore.

Infine, tramite un HUB USB sono stati collegati al pc sia la scheda Arduino con il microcontrollore, sia il dispositivo di visualizzazione descritto precedentemente.

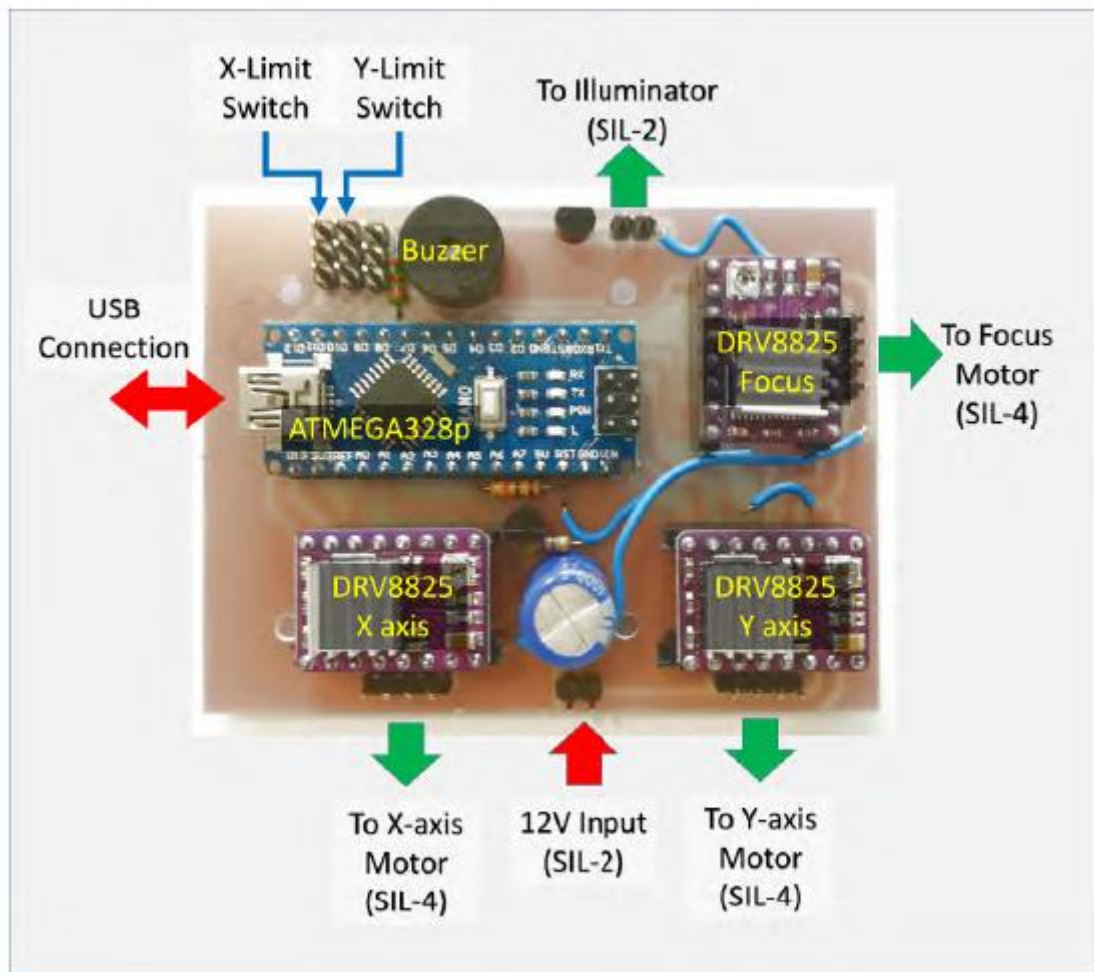


Figura 13 - Vista dall'alto del circuito stampato e dei relativi collegamenti di ingresso e uscita

2.2.4 La progettazione del contenitore del dispositivo

Gli autori di questo progetto hanno progettato personalmente anche il contenitore del sistema di visualizzazione e dell'intero dispositivo.

La scelta dei materiali si è orientata su prodotti facili da trovare e a buon mercato, mentre per le dimensioni si è tenuto conto del fatto che il dispositivo deve essere collocato all'interno di un incubatore standard.

Il telaio è stato realizzato con un profilo sigma di 20mm x 20 mm, robusto ma con un peso ragionevole, ed è stato acquistato online già nelle misure desiderate, pronte per l'assemblaggio.

Le coperture laterali in acrilico invece sono state progettate con AutoCad e ritagliate con una macchina laser CNC.



Figura 14 - Realizzazione del telaio. in a vediamo i profili sigma, in b la parte inferiore del dispositivo assemblata, in c il risultato finale dell'assemblaggio

2.2.5 Il supporto per la piastra

Per poter inserire in modo pratico le piastre, è stato progettato un cassetto scorrevole lungo 18 cm, dotato di 4 supporti per la piastra da visualizzare. Il telaio di questo cassetto è stato fatto sempre in acrilico, con al centro una piastra trasparente per permettere alla luce Led di illuminare le celle.

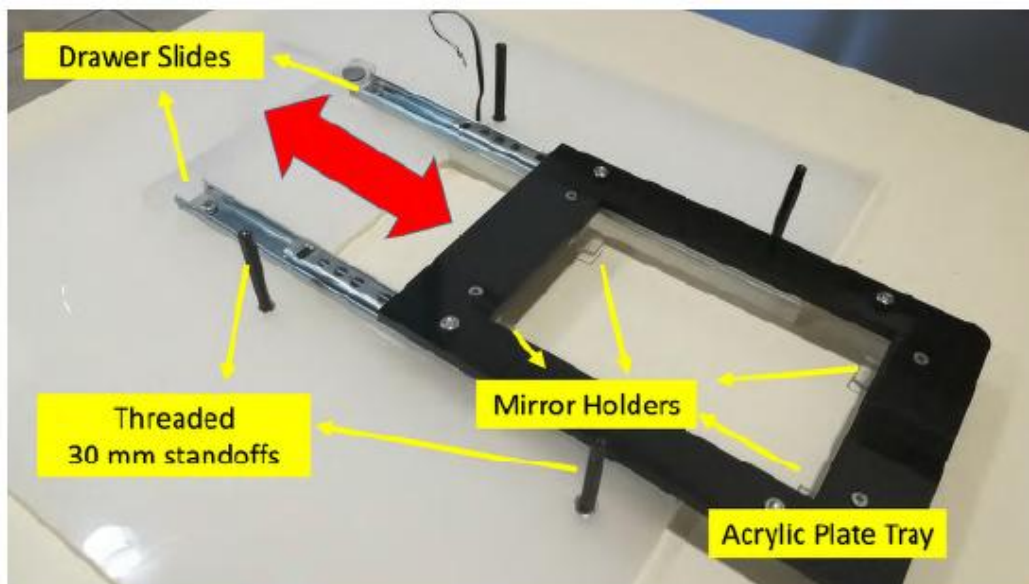


Figura 15 - Il supporto scorrevole per la piastra

2.2.6 L'illuminazione a LED

L'illuminazione a LED, collocata nella parte più alta del dispositivo, deve agire come nella microscopia a campo chiaro invertita, attraversando quindi le varie celle che poi verranno osservate dalla videocamera.

E' stato progettato uno strato costituito da 165 LED, molto luminosi da 5mm (Vishay Semiconductor GmbH, Germania) che ricoprono una superficie di 8cm x 12 cm: è stato pensato di distanziare i LED per far sì che ciascuno fosse al di sopra di una singola cella, ma siccome il dispositivo è stato progettato per supportare 6 diverse tipologie di piastre non è stato possibile trovare una distanza univoca per tutte.

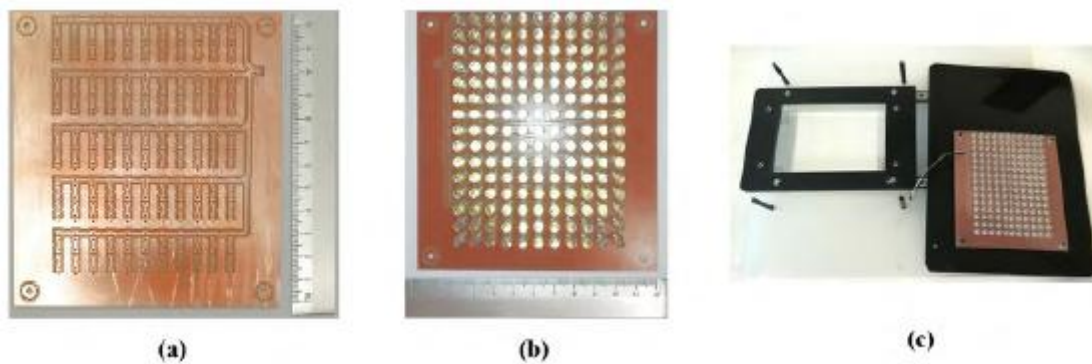


Figura 16 - in a è presente il supporto per i led, in b sono stati saldati i LED, in il risultato finale

Inizialmente, gli autori avevano pensato di poter gestire un'area di LED che si accendesse ogni volta in base alle dimensioni della superficie da visualizzare, ma il cambio di numero di LED da accendere causava una differenza nei livelli di illuminazione tale da far decidere infine di accendere tutte le luci in parallelo.

2.3 Presentazione del microcontrollore e della programmazione dell'interfaccia operatore

2.3.1 Diagrammi di flusso e funzioni

Vediamo ora quale è stato lo sviluppo degli algoritmi per il microcontrollore (Atmega328P su Arduino Nano) e la creazione dell'interfaccia operatore (tramite Python su un computer)

L'interfaccia operatore è stata sviluppata in Pyton mediante il tool di sviluppo Qt-designer, mentre per il microcontrollore è stato utilizzato l'ambiente di sviluppo integrato di Arduino.

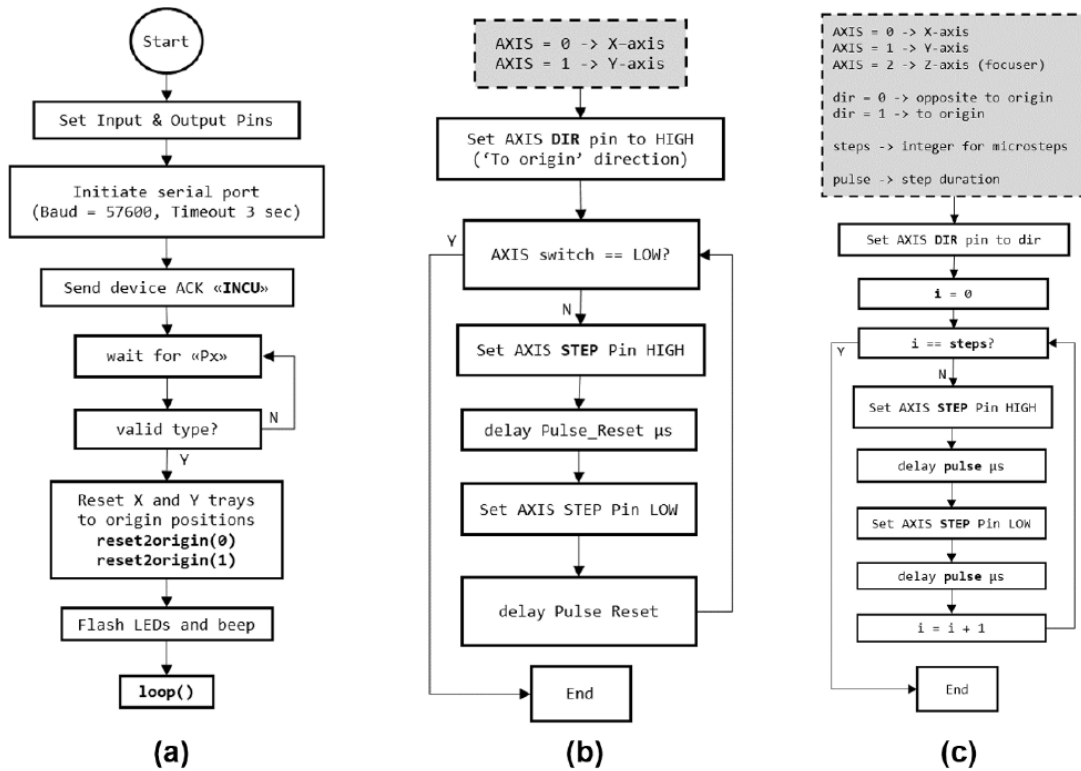


Figura 17 - Alcuni diagrammi di flusso per il microcontrollore

I diagrammi di flusso presenti qui sopra sono stati progettati per l'iniziazione del microcontrollore e per la gestione del motore: a) nel primo diagramma di flusso si vede come viene fatta inizialmente la lettura dello stato degli ingressi e delle uscite, inizializzata la porta seriale per la comunicazione con il pc, mandato un segnale di acknowledge e dopo aver letto se il tipo di piastra selezionata è valida (Px, con x da 0 a 4), si proceda con un reset dei due assi. Viene infine richiamata la funzione loop(), che richiama a sua volta una funzione decodeMove() che decodifica messaggi predefiniti presenti in parti di codice e assegnazioni di variabili globali, come mostrato nella tabella seguente

Message	Task ID	Description
"XmYnn"	1	Go to Well
"Zn", "Zp"	2	Focus (Coarse)
"xn", "xp"	3	X axis browsing
"yn", "yp"	4	Y axis browsing
"zn", "zp"	5	Focus (Fine)
"G"	6	Start sub-grid capture
"rxxcyy"	7	Setup sub-grid rows and columns
"ip", "in"	8	Illumination on, off
"F"	0	Reset trays and plate type

Figura 18 - Decodifica dei messaggi

b) è la funzione richiamata in a) `reset2origin`, la quale alza il pin della scheda che comanda la direzione del motore verso la posizione di riposo, e poi controlla di arrivare al finecorsa, comandando a impulsi il pin di start del motore passo-passo finché non lo incontra.

c) invece gestisce gli assi XYZ. Inizialmente in questo diagramma di flusso viene settato il pin di direzione del motore che muove l'asse, e inizializzata la variabile `i`, viene mandato avanti il motore di un certo numero di passi fino ad arrivare al numero indicato nella variabile `steps`.

Richiamando questa funzione negli algoritmi del microcontrollore, gli assi XYZ si muoveranno del numero di passi scelto dall'operatore nell'interfaccia per poter posizionarsi sulla cellula da osservare.

2.3.2 I messaggi e il controllo del dispositivo di visualizzazione

Il compito del microcontrollore è quello di gestire i motori passo-passo, l'illuminazione e il cicalino: i due motori degli assi XY compiono un movimento coassiale mentre lungo l'asse Z, la messa a fuoco è gestita invece da una scheda DRV8825.

L'illuminazione, come detto in precedenza, necessaria per simulare un microscopio ottico in campo chiaro, è generata da un array di LED bianchi.

All'inizio del ciclo di acquisizione dell'immagine, tutti i LED sono accesi per più di 5 secondi. Il tempo di accensione dei LED durante l'intero ciclo di acquisizione di una piastra dipende ovviamente dal numero di celle.

Il cicalino invece è stato inserito per creare avvisi e allarmi per l'operatore.

Dall'interfaccia operatore sul PC vengono scambiati i messaggi con il microcontrollore, collegati tra loro tramite una interfaccia seriale e un convertitore USB.

Uno di questi messaggi, molto importante, avvisa l'operatore se è presente o meno l'alimentazione esterna che comanda i motori: tramite la funzione `checkPower()`, non mostrata nei diagrammi, viene letto lo stato di un pin della scheda dove è collegata l'uscita della circuiteria dell'inverter.

2.3.3 Il movimento verso una cella specifica

Nello stato iniziale della macchina, il dispositivo di immagine può muoversi solo verso la cella desiderata, oppure si può resettare il tipo di piastra attuale, con gli assi X e Y che si riportano nella loro posizione di partenza.

L'indirizzo della cella viene stabilito dalla stringa "XmYnn", con X che è indicizzato a lettera mentre Y a numeri.

Dunque, ipotizzando di voler osservare una cella in una piastra da 96, di dimensioni 8 x 12 celle, l'asse X viene posto in corrispondenza del lato minore e Y su quello maggiore.

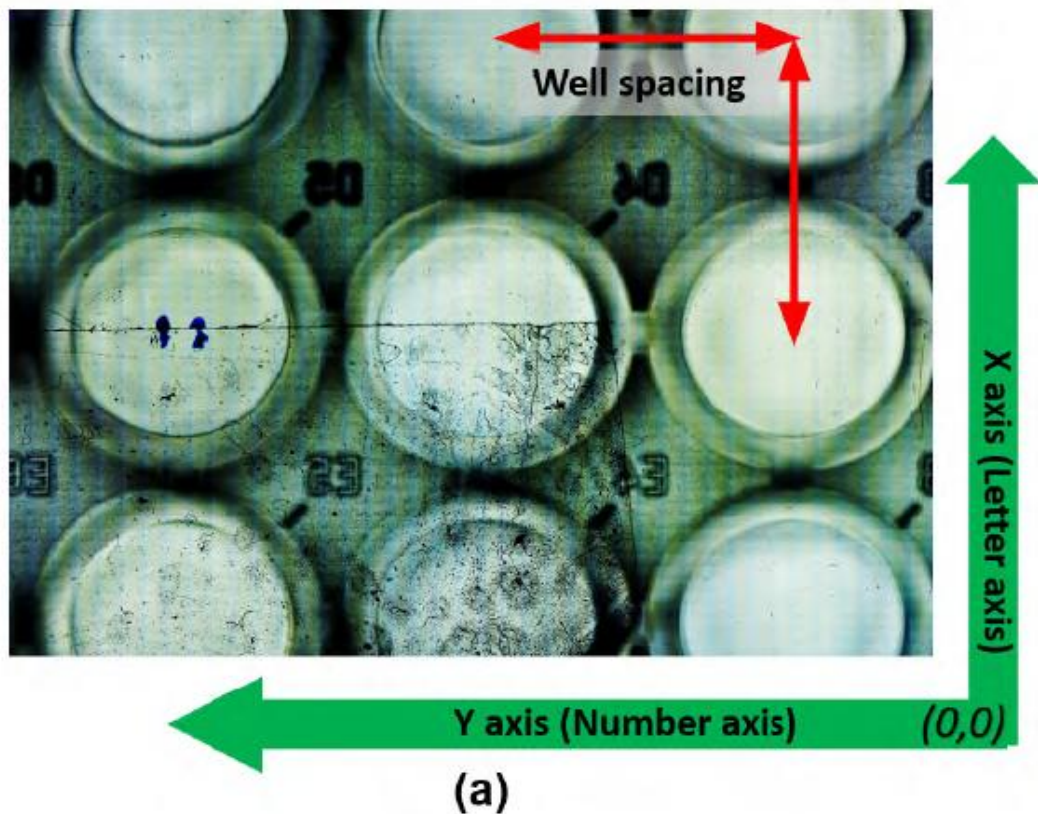


Figura 19 – Cella D4 di una piastra da 96 celle

Se l'operatore inserisce la stringa "X3Y09" verrà visualizzata la cella C-9, e quindi la terza sull'asse X e la nona sull'Y.

Per poter osservare piastre di dimensioni diverse, occorre fare una calibratura tra i micro passi dei motori e lo spazio che intercorre tra i centri di due celle vicine, salvando i dati in arrays globali da richiamare nella funzione stepXYZ().

2.3.4 La ricerca ottimale della posizione e la messa a fuoco

Dopo un qualsiasi movimento iniziale dalla posizione di home alla cella selezionata, il componente di visualizzazione può muoversi per una ricerca ottimale della cella nell'incubatore.

Il motore passo-passo e la dimensione della vite di posizione permettono una risoluzione di 800passi/mm, ma durante il cambio di direzione gli autori del dispositivo hanno tenuto conto anche del gioco che viene a crearsi in questa manovra aggiungendo dei passi alla destinazione successiva.

Per ottenere un posizionamento migliore, è stata implementata una modalità in “Live View” così che l’operatore possa vedere in tempo reale le celle, modalità presente normalmente solo su costosi dispositivi commerciali.

Per quanto riguarda l’asse Z invece, il movimento è ottenuto tramite una lente motorizzata, e per avere maggiore accuratezza è stato permesso a questo asse solo di scendere per mettere a fuoco il contenuto della cella: ogni volta che viene richiesto un movimento nella direzione contraria, la lente torna nella posizione originaria in alto e azzerata il conteggio dei passi.

2.3.5 Configurazione della sottogriglia

Il sistema può essere configurato per catturare immagini delle celle tramite una scansione meccanica sugli assi XY fornendo un numero selezionabile di sottogriglie.

Questo permette di avere un campo visivo allargato senza perdere risoluzione ottica spaziale con l’utilizzo dell’economico sensore CMOS in dotazione.

Per esempio, con la stringa “r05c07” gli autori hanno sviluppato nel codice la possibilità di catturare un’immagine aumentata di 5 righe per 7 colonne, rendendo così il dispositivo indipendente dal tipo di piastra selezionata.

Questa immagine così ottenuta può successivamente essere ridimensionata di un certo fattore di riduzione: nell’immagine di figura a) per esempio, è stata impostata una acquisizione di 53 righe x 41 colonne con un fattore di riduzione di 0.1.

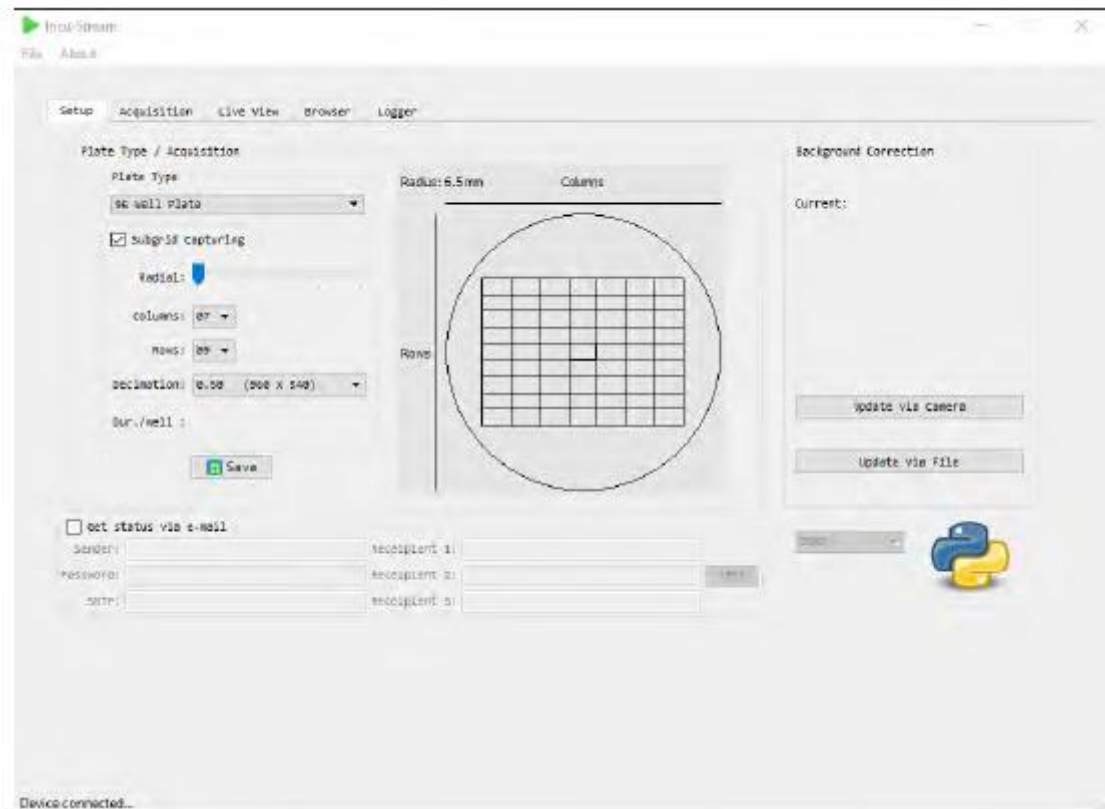
2.3.6 Il controllo del movimento nella sottogriglia

Tramite una serie di istruzioni, l’operatore può iniziare l’acquisizione delle immagini nella sottogriglia selezionata.

Dalla cella raggiunta tramite i comandi “XmmYnn” e con l’ulteriore stringa “rxxcyy” il dispositivo inizia ad acquisire le immagini dopo il comando “G”.

Terminata la procedura, il microcontrollore risponde con un “W” visualizzandolo sull’interfaccia operatore, e richiama la funzione `decodemove()`.

Nell'interfaccia grafica inoltre è stata inserita la possibilità di regolare il sensore CMOS, la regolazione della messa a fuoco, la cattura e il salvataggio delle immagini sul disco del computer.



2.3.7 La durata di acquisizione della sottogriglia

Il tempo necessario a catturare l'immagine di una sezione di piastra dipende in maniera maggiore dalla configurazione della piastra, e quindi dalle dimensioni selezionate, ma per una singola cella il discorso va approfondito: la durata è determinata in questo caso da quanto tempo è necessario a stabilizzare l'immagine. Occorre infatti introdurre alcuni ritardi dopo ogni passo del motore per essere sicuri di non avere immagini sfocate, e solo tramite alcuni test gli autori sono riusciti ad ottimizzare questi tempi per garantire anche una certa performance del sistema.

A titolo di esempio, durante i test il tempo di acquisizione di una sottogriglia di 5 cm x 5 cm è stato di 21 secondi, mentre quello per una sottogriglia di 10 cm x 10 cm è stato di 86 secondi.

2.3.8 La programmazione dell'interfaccia operatore

Per la creazione dell'interfaccia operatore sono stati utilizzati due software: il primo di questi si chiama Qt-Designer ed è stato impiegato per lo sviluppo della parte grafica dell'interfaccia con cui l'operatore interagisce. Successivamente il file generato dal Qt-Designer è stato convertito in uno script in Python, e con l'utilizzo del secondo software, Spyder 2, sono stati aggiunti degli algoritmi. Come già accennato in precedenza, il programma dell'interfaccia è stato sviluppato per poter essere eseguito su qualsiasi sistema operativo. Sono state create 5 schede con altrettante funzionalità: Parametri, Acquisizione, Video in diretta, Navigazione e Registro.

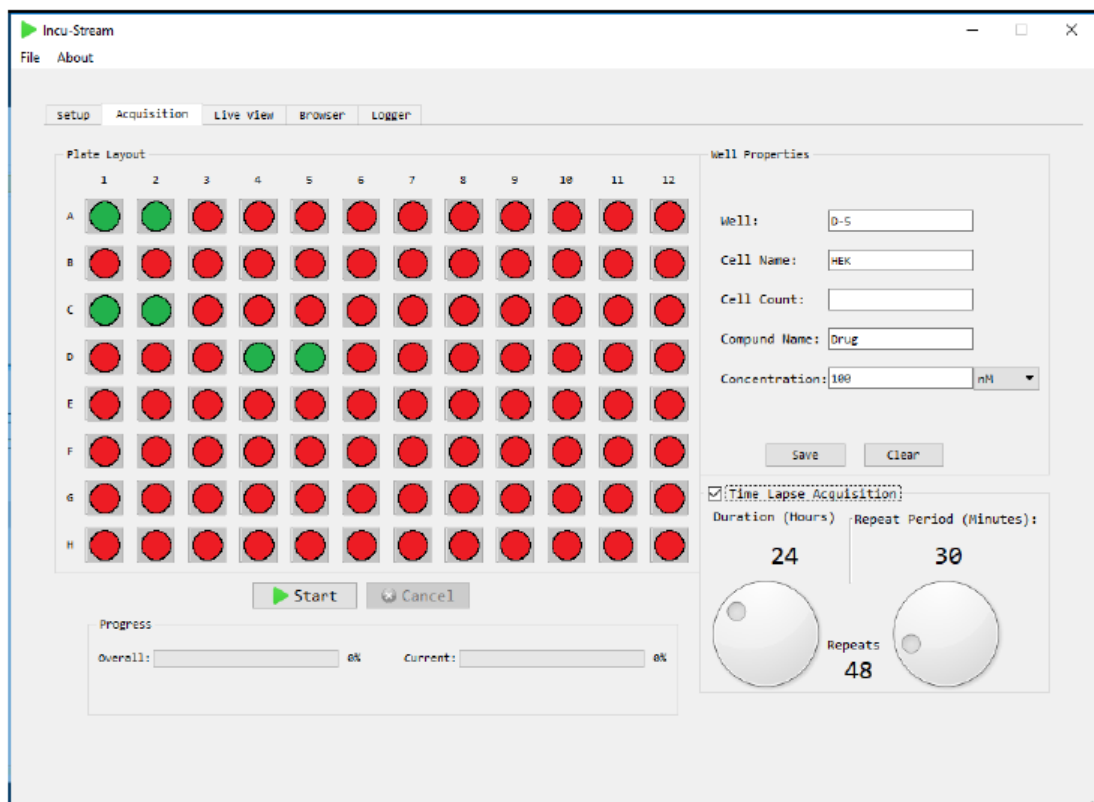


Figura 20 - Scheda "Acquisition" dell'interfaccia operatore

Appena eseguito, il programma ricerca una porta COM disponibile e attende il consenso "INCU" dal microcontrollore. Una volta ricevuto, l'interfaccia parte e mostra l'avvenuta connessione al microcontrollore tramite un messaggio. Nella scheda "Setup", l'operatore deve selezionare il corretto tipo di piastra e la giusta configurazione di sottogriglia che intende utilizzare, decidendo il numero di righe e di colonne.

Sono state introdotte la funzionalità di ridimensionamento delle scansioni eseguite e la possibilità di configurare degli avvisi via mail.

Nella scheda di Acquisizione, l'operatore ha diverse funzionalità disponibili:

- può abilitare o disabilitare la registrazione automatica della cella
- può inserire manualmente delle informazioni testuali alle immagini (nome, data, composizione...)
- può acquisire le immagini in modalità "Time Lapse" con durata impostabile liberamente



Figura 21 - Scheda "Live View" dell'interfaccia operatore

Nella modalità "Live View" l'operatore può navigare tra le celle tramite le frecce del sotto-menu "Navigator" osservando in tempo reale ogni singolo dettaglio mantenendo la videocamera accesa finché desidera, e con la possibilità aggiuntiva di salvare delle istantanee. Come si vede dalla figura qui sopra, è riportata la scala

utilizzata, e sono disponibili anche una serie di strumenti necessari a migliorare la qualità dell'immagine: luminosità, contrasto, saturazione, esposizione, nitidezza e correzione del campo piatto. Inoltre, siccome per vedere al meglio ogni cella l'operatore deve cambiare lo zoom, è stata sviluppata anche la possibilità di salvare la posizione di messa a fuoco per ciascuna cella.

2.3.9 La Calibrazione della scala dell'immagine

I ricercatori sono partiti acquisendo le immagini con la massima risoluzione possibile per la lente installata (1920 x 1080) mantenendo la stessa distanza per semplicità nella calibrazione. Per avere immagini più piccole, invece di ridurre la risoluzione della lente, hanno preferito ritagliare le immagini perché nel primo caso si sarebbe verificato un cambio di scala. Per determinare invece il campo visivo, è stato utilizzato il vetro di un microscopio spesso 0.1 mm e con un diametro di 20mm, che ha restituito delle immagini dove a 0.1 mm corrispondono 280 pixels in entrambe le direzioni.

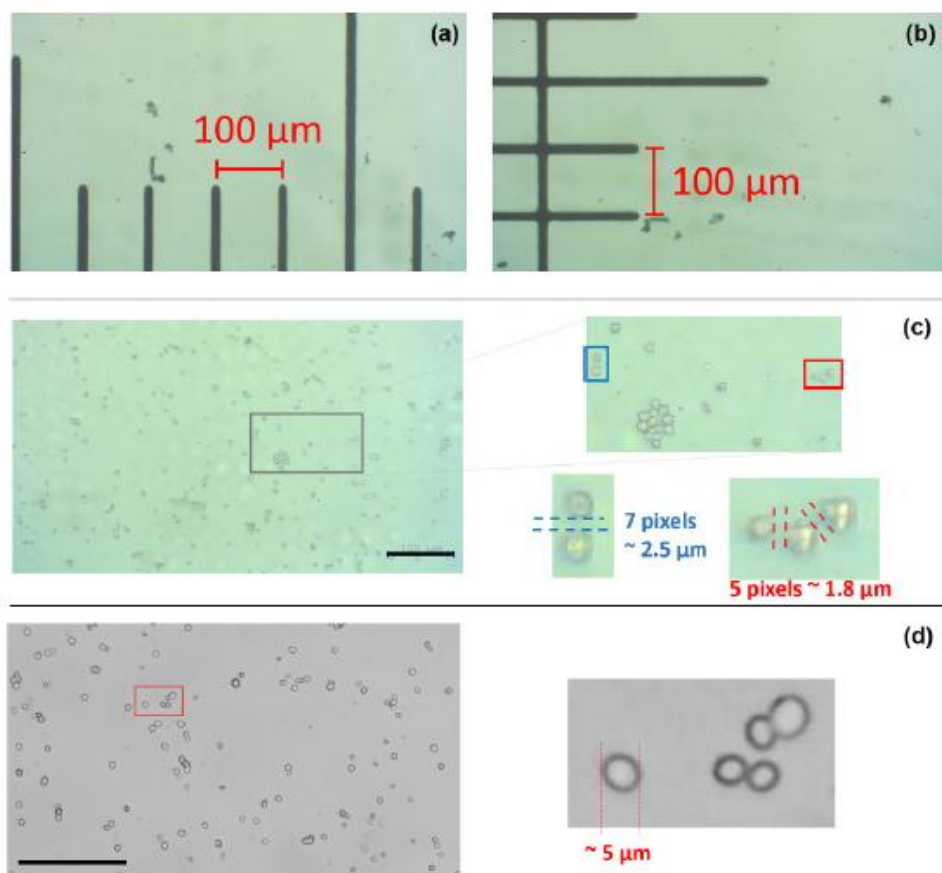


Figura 22 - Determinazione del campo visivo e della risoluzione

Nelle figure qui sopra a e b, si vede come è stato posizionato il vetro per la calibrazione, allineato prima con l'asse orizzontale e poi con quello verticale.

Nella figura c si vede invece un test di risoluzione dove sono state utilizzate cellule di lievito, mentre in figura d è riportata una immagine acquisita tramite un microscopio convenzionale.

La lente scelta è risultata quella giusta per le aberrazioni geometriche perché non sono state osservati difetti gravi nelle linee del vetro di calibrazione. Per quanto riguarda la configurazione con la lente invertita, il campo visivo orizzontale è risultato essere di $(1920 / 280) \times 0.1 = 685 \mu\text{m}$ mentre quello verticale di $(1080 / 280) \times 0.1 = 385 \mu\text{m}$.

2.3.10 L'ingrandimento e la risoluzione

Dai test di calibrazione i ricercatori hanno evinto che l'ingrandimento totale della lente invertita è di circa 8.5X. In termini di microscopia, un simile ingrandimento è ottenuto utilizzando un oculare standard da 10X e un obiettivo da 26X, in grado dunque di distinguere cellule di circa 1.8 μm di distanza. Questo risultato è leggermente inferiore rispetto a quello ottenuto da un microscopio convenzionale, ma risulta comunque adeguato per studiare le colture cellulari.

2.4 Test e validazione del dispositivo

I primi test del sistema si sono concentrati sull'affidabilità dell'interfaccia operatore e sulla tenuta meccanica dei componenti all'interno di un incubatore. Il programma dell'interfaccia operatore è stata installato su un computer portatile con Windows 10 a 64 bit come sistema operativo, un processore Intel Core i-7-5500 da 2.4 Ghz, 8 GB di RAM e disco rigido da 320 GB. L'affidabilità del dispositivo è stata valutata tenendo conto che negli studi sulle cellule umane, i valori impostati negli incubatori sono solitamente 37 °C di temperatura, 95% di umidità e 5% di CO₂.

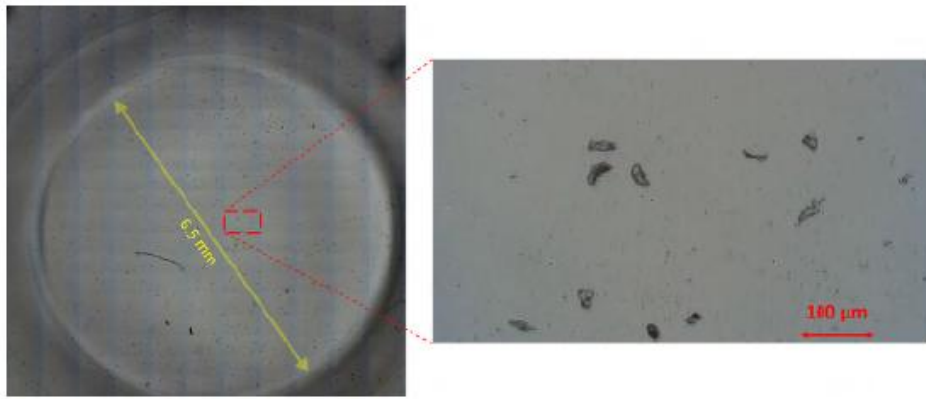


Figura 23 - L'immagine di una cella ingrandita. In questa cella è stata inserita dell'acqua e successivamente è stata toccata con un dito

L'immagine qui sopra è stata acquisita durante i test all'interno dell'incubatore, muovendo in manuale il dispositivo sulla cella C4 di una piastra da 96 celle, ridotta poi con un fattore di riduzione dell'immagine di 0.5. La sottogriglia è stata poi portata a 11 colonne per 19 righe portando l'immagine a 10560 x 10260 pixels, ma è stata messa a fuoco facendo riferimento allo strato inferiore della piastra così che il bordo della cella posizionata sullo strato superiore è risultato senza sfocatura. Dopo adeguate preparazioni, sono stati eseguiti diversi test con cellule embrionali di rene umano e con linee cellulari affette da cancro del seno.

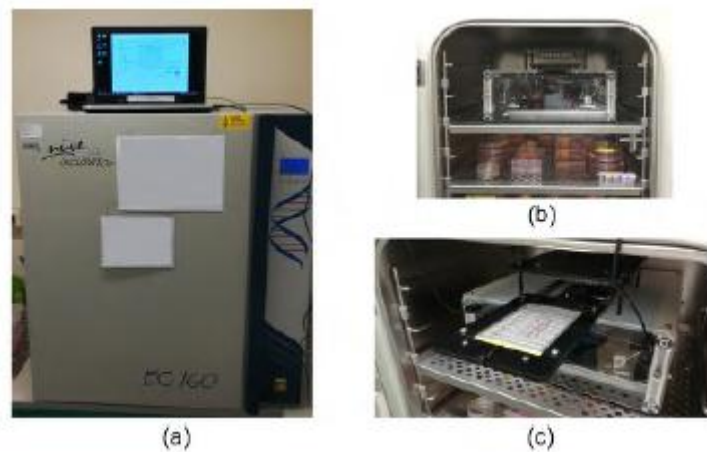


Figura 24 - Fasi di test del dispositivo

La figura 24 mostra alcune fasi dei test: in a è stato posizionato il pc sopra all'incubatore per gestire l'interfaccia operatore, in b viene mostrato il dispositivo all'interno, in c vediamo una piastra da 96 celle inserita sul porta-piastra estraibile.

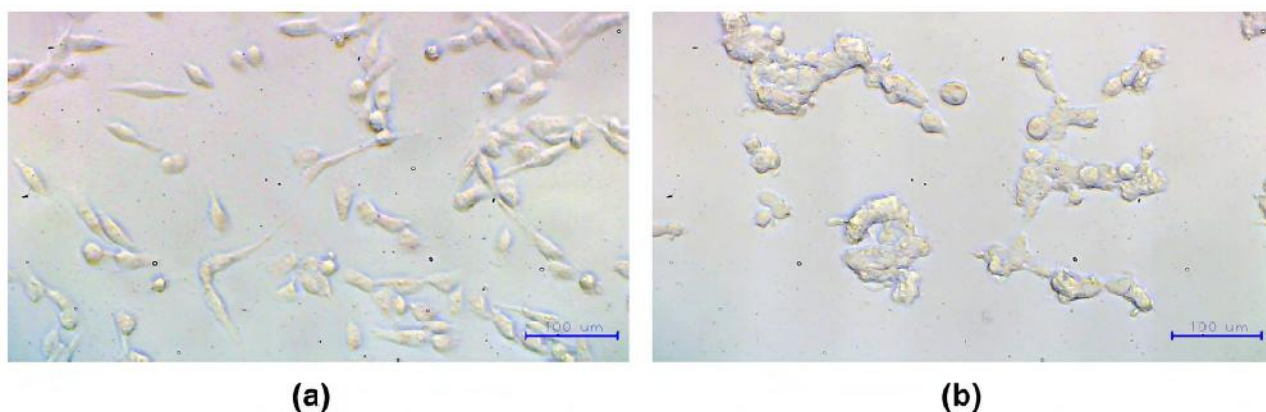


Figura 25 - Immagini ottenute acquisendo la schermata durante la modalità "Live View"

Le immagini di figura 25 sono del primo test del dispositivo, comandato in manuale in modalità "Live-View": queste prime immagini sono state ottenute catturando lo schermo. La dimensione è di 1920 x 1080 e la scala è di 100 μm . Per quanto riguarda i test della modalità "Time Lapse", la cella D4 è stata selezionata come cella di partenza e la D5 come quella bersaglio, e il tempo di acquisizione è stato impostato a 12 ore, con un intervallo tra una immagine e l'altra di 60 minuti.

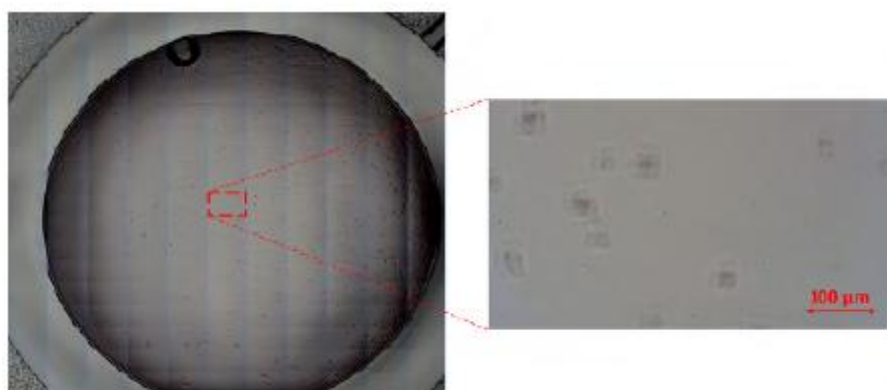


Figura 26 - Immagine della cella D4 durante i test della modalità "Time Lapse"

I risultati ottenuti da questa modalità sono stati buoni per quanto riguarda l'allineamento del dispositivo durante un test sul lungo termine di questo tipo, tuttavia le immagini acquisite sono risultate leggermente sfocate rispetto a quella della modalità manuale, come si vede nella figura 26.

Dopo una serie di test successivi dentro all'incubatore, i ricercatori hanno scoperto che la perdita di messa a fuoco era determinata dal gioco meccanico delle lenti durante il movimento, peggiorato a causa dell'aumento di temperatura. Per risolvere questo problema, è stato migliorato l'algoritmo di posizionamento, facendo partire le lenti dalla posizione di origine degli assi ogni volta che dovevano muoversi per iniziare un ciclo di acquisizione.

Infine, per dimostrare l'utilizzo del sistema in tempo reale, i ricercatori hanno osservato i movimenti del *C. elegans*, e tramite il programma OBS Studio hanno registrato dei video a 30 fotogrammi al secondo.



Figura 27 - Schermate acquisite da registrazioni video dei movimenti del verme *C. elegans*

3 - Conclusioni

Il sistema Incu-Stream presentato, progettato per lavorare con le piastre per microtitolazione all'interno di incubatori, è stato anche testato per verificare la perdita di vitalità cellulare indotta da farmaci chemioterapici su archi temporali maggiori di 48 ore. Il vantaggio di avere un hardware a basso costo e un software privo di licenze di terze parti da acquistare, unito alla facilità di utilizzo dell'interfaccia anche da parte di personale non altamente specializzato, lo rende uno strumento molto adatto e indicato per tutti quei laboratori di microbiologia e di colture cellulari che non possono permettersi dei sistemi commerciali.

Item Name	Cost (\$)
USB camera module (2MP)	35
Motorized Lens	15
NEMA 17 Stepper Motors, 2 pieces	16
Motor drivers (DRV8825), 3 pieces	5
Arduino Nano	3
White LEDs (Vishay), 200 pieces	20
20 x 20 PCB layer	2
Drawer slides, 2 pieces	6
Couplings, linear rods, holders and trays	40
Acrylic Layers	15
Sigma Profiles	10
Nuts and other mechanical connectors	10
Power adapter (12V/3A)	5
USB hub	2
TOTAL	184

Figura 28 - Tabella dei costi delle parti utilizzate

Come si può vedere dalla tabella in figura 28, i vari oggetti acquistati non superano i 200 dollari americani, tuttavia non sono stati inseriti alcuni costi extra come la realizzazione della scheda PCB e il taglio laser tramite una macchina CNC. La scelta di utilizzare un sensore CMOS a colori equipaggiato con una lente varifocale CCTV si è

dimostrata migliore rispetto alle lenti con messa a fuoco fissa utilizzate in studi precedenti di altri ricercatori. Grazie a questa modifica, è possibile ottenere distanze di lavoro più lunghe e si ha la possibilità di mettere sempre a fuoco le cellule, così come avviene nei costosi dispositivi commerciali. Il dispositivo si è inoltre dimostrato affidabile, robusto e compatibile con la maggior parte delle piastre utilizzate negli studi sulle colture cellulari, e grazie agli algoritmi di posizionamento è stata migliorata la messa a fuoco nelle immagini sul lungo periodo rispetto a dispositivi presentati da altri ricercatori. La possibilità di creare automaticamente immagini in microscopia a campo chiaro, realizzare video in “Time-Lapse” fino a 72 ore e poter navigare dall’interfaccia sulla superficie delle piastre si sono rivelate delle caratteristiche vincenti di questo sistema. Come miglioramenti successivi, gli autori si sono prefissati di migliorare l’algoritmo e l’hardware della lente CCTV per poter gestire al meglio l’ingrandimento, e per quanto riguarda l’interfaccia operatore stanno sviluppando delle nuove funzionalità per il miglioramento dell’immagine.

Ringraziamenti

Arrivato al termine del mio percorso universitario, desidero ringraziare le persone che ne hanno fatto parte, accompagnandomi e sostenendomi, ognuno in modo diverso.

Sicuramente il mio percorso universitario è stato abbastanza atipico ed anche ostico sotto tanti punti di vista, per vari motivi. Tuttavia, essere riuscito a concluderlo mi da comunque oggi tanta soddisfazione e mi lascia maggiore curiosità verso il mondo della biomedica.

Vorrei ringraziare innanzitutto il mio relatore Professor Emanuele Giordano per avermi proposto questo argomento per la tesi ed avermi seguito durante tutta la fase di stesura: lavoro nell'ambito dell'automazione e mi è piaciuto molto aver trovato questo connubio con la biochimica, non pensavo inizialmente di poter scrivere di un argomento così affine a me e appassionante.

Devo ringraziare la mia famiglia che mi ha sostenuto nel terminare gli studi interrotti un po' di tempo fa, nonostante il tempo da dedicargli sia stato molto poco.

Un ringraziamento speciale va alla mia dolce metà, Laura, senza la quale non credo sarei riuscito a raggiungere questo traguardo: il tuo sostegno e l'aver condiviso con me tutto, ansie e gioie, è stato davvero fondamentale per me.

Bibliografia

[1] Gian Luigi Mariottini, Valter Capiccioni, Lucrezia Guida, Francesca Mattioli, Susanna Penco, Paola Romano, Linda Scarabelli – Introduzione alle colture cellulari – Seconda edizione (2010)

[2] Autori Vari Wikipedia Inc. https://it.wikipedia.org/wiki/Coltura_cellulare

[3] Principi pratici ed esempi di colture cellulari(pdf) – Dott.ssa Valeria Berton – Università di Verona

[4] Autori Vari Wikipedia Inc. https://it.wikipedia.org/wiki/Telomero#Estensione_dei_telomeri_e_cancro

[5] G. Gürkan, K. Gürkan: Incu-Stream 1.0: Open-Hardware Live-Cell Imaging System. IEEE Access, 7:58764-58779 (2019) DOI: 10.1109/ACCESS.2019.2914958

[6] Controlling a stepper motor with the DRV8825 <https://www.makerguides.com/drv8825-stepper-motor-driver-arduino-tutorial/>