



Università di Pisa

Facoltà di Ingegneria

Corso di Laurea in Ingegneria Biomedica

Tesi di Laurea Specialistica

Ottimizzazione di un bioreattore “High Throughput” con strategia di controllo autonoma.

Relatori:

Prof.sa Arti Ahluwalia

Dott. Antonio Cisternino

Ing. Giovanni Vozzi

Candidato:

Daniele Mazzei

A Vera ed ai miei genitori.

Ringraziamenti

Numerose sono le persone che mi hanno assistito durante questo lavoro di tesi, e tutte meritano un caloroso abbraccio.

Prima fra tutti devo ringraziare Vera che, con la sua pazienza, mi ha sopportato durante i periodi più stressanti.

Ci tengo a ringraziare di cuore il Dott Antonio Cisternino, per avermi accompagnato per mano nel mondo dell'informatica, mentre il caro amico Dott Vincenzo Gervasi ci sosteneva e supportava con la sua personale "enciclopedia".

Un grosso grazie va alla professoressa Arti Ahluwalia ed all'Ing Giovanni Vozzi, per la fiducia che hanno riposto in me, ma, soprattutto, per avermi sempre trattato come un amico, piuttosto che come studente.

Devo ringraziare naturalmente anche Cavy e Priscilla, che mi hanno fatto compagnia durante i pomeriggi passati al computer.

Ringrazio inoltre Stich, arrivato da poco, ma già protagonista delle mie giornate.

Infine voglio ringraziare: "In quanto", "Quindi" e "Inoltre" poiché, senza di loro, questo lavoro di tesi non sarei mai riuscito a scriverlo.

Indice

Indice	4
Introduzione	6
Capitolo 1 L'importanza dei bioreattori nella ricerca.	9
1.1 Il Bioreattore	12
1.2 La sperimentazione animale	14
1.3 La nostra proposta	17
Bibliografia	20
Capitolo 2 L'High Throughput Screening	21
2.1 Utilizzi odierni dell'HTS	23
2.2 L'High Throughput ed i bioreattori	27
2.3 Rendere un Bioreattore High Throughput.....	30
Bibliografia	34
Capitolo 3 Il bioreattore attuale ed i propri limiti.....	35
3.1 La camera di miscelazione	36
3.2 L'hardware di controllo elettrovalvole e lettura sensori.	40
3.3 La scheda National e il PC	43
3.4 Limiti software	46
Bibliografia	51
Capitolo 4 Obiettivo della tesi.....	52
4.1 La nuova camera di miscelazione	54
4.2 Il nuovo sistema di riscaldamento	60
4.3 Elettronica di controllo	65
Bibliografia	71
Capitolo 5 Il software	72
5.1 Robotics4.Net	74
5.2 Lo Heap	80
5.3 La comunicazione	85
5.4 Architettura del software	89
5.5 L'algoritmo di controllo del pH	93

5.6	L'interfaccia.....	98
	Bibliografia	109
Capitolo 6	Apparato elettronico	110
6.1	L'alimentatore duale.....	113
6.2	Circuito di adattamento del segnale.....	114
6.3	Il convertitore Digitale Analogico.	117
6.4	Collegamento del sistema	119
	Bibliografia	122
Capitolo 7	Risultati	123
7.1	La camera di miscelazione	124
7.2	Il sistema di riscaldamento	126
7.3	L'elettronica di controllo	128
7.4	Il software	131
7.5	Analisi dei costi.	135
	Conclusioni.....	138
Appendice A	Schemi elettrici	141
7.6	Alimentatore duale ± 12 Volt	141
7.7	Circuito di conversione del segnale	142
Appendice B	Datasheet.....	143
7.8	Scheda National Instruments PCI	143
7.9	Scheda National Instruments USB	144
7.10	Convertitore D/A DAC0808.....	145
7.11	Regolatori di tensione LM7805 - LM7812	146
7.12	Regolatore di tensione LM7912	147
7.13	Amplificatore operazionale TL084.....	148

Introduzione

Negli ultimi anni si è assistito ad una vera e propria rivoluzione dal punto di vista tecnologico. Questa rivoluzione ha portato a notevoli cambiamenti nelle metodiche di testing biologico e cellulare. Basti pensare all'avvento delle nuove metodologie di analisi High Throughput, grazie alle quali è oggi possibile eseguire esperimenti in tempi molto brevi, estraendo da questi molti dati.

Purtroppo non siamo ancora riusciti ad eliminare una delle piaghe della ricerca medico biologica: la sperimentazione animale. Si stima che, nel mondo intero, vengano uccisi ogni anno almeno 300 milioni di esemplari. Appurato che, al giorno d'oggi, la sperimentazione animale è, per la ricerca un mezzo indispensabile, è dovere della comunità scientifica lavorare affinché si riesca a ridurre al minimo il numero di cavie animali immolate.

In questo contesto si inserisce perfettamente il presente lavoro di tesi, che si prefigge lo scopo di ottimizzare un bioreattore High Throughput al fine di trasformarlo da prototipo in fase di testing, a macchinario finito e commercializzabile.

Nel 2000, presso il Centro Interdipartimentale di Ricerca E.Piaggio, è stato realizzato il primo prototipo di bioreattore capace di controllare la pressione, il flusso, la temperatura ed il pH di una coltura cellulare in modo automatico e per intervalli di tempo prolungati.

Questo bioreattore permetteva inoltre l'osservazione delle colture cellulari sotto microscopio, in quanto non necessitava di essere inserito in un incubatore per il mantenimento delle variabili ambientali necessarie alla sopravvivenza della coltura cellulare.

Durante questo lavoro di tesi si è provveduto ad una completa ristrutturazione di questo prodotto, al fine di renderlo un sistema di coltura e testing cellulare commercializzabile e utilizzabile anche da utenti non aventi conoscenze di tipo ingegneristico.

Si è provveduto all'ottimizzazione della camera di miscelazione e del sistema di riscaldamento del terreno che, grazie alle nuove modifiche, sono diventati perfettamente compatibili con le nuove metodologie di analisi High Througput.

E' stato realizzato un sistema di riscaldamento capace di mantenere in temperatura contemporaneamente 4 camere di miscelazione con l'utilizzo di un unico bagnetto termostatico, così da risparmiare sugli spazi necessari per l'installazione del sistema.

La grande innovazione apportata durante questo lavoro è, però, nel sistema di controllo del bioreattore. In precedenza, l'intero apparato, era controllato mediante una scheda di acquisizione dati della National Instruments, collegata ad un PC. Nel nuovo bioreattore la scheda National Instruments, è stata sostituita con una scheda di controllo Wildfire, capace di controllare in modo autonomo il bioreattore, che adesso non necessita più di un PC dedicato, ma può essere collegato alla rete Ethernet.

L'esperimento verrà osservato poi mediante un'apposita interfaccia, anch'essa sviluppata nel corso di questo lavoro di tesi.

La suddetta modifica ha portato a dover completamente riscrivere il software di controllo e gestione del bioreattore. È stato scritto quindi un vero e proprio sistema operativo per la scheda di controllo Wildfire.

Questo sistema operativo è stato realizzato utilizzando una libreria di controllo per robot, il Robotics4.NET, sviluppata dal Dipartimento di Informatica dell'Università di Pisa.

Sarà possibile, mediante il nuovo sistema, condurre contemporaneamente esperimenti su più bioreattori, simulando così varie cavie, permettendo quindi una riduzione dei soggetti animali necessari alla sperimentazione nonché, un aumento delle performance dei test di laboratorio.

Attualmente i test cellulari vengono condotti in ambiente statico; questo approccio di coltivazione è in realtà una vaga approssimazione della realtà biologica, che le colture dovrebbero rappresentare. Questa approssimazione rende molto difficile l'esportazione dei dati ricavati dalle colture cellulari ai tessuti in vivo, e quindi all'uomo. Grazie al nuovo sistema di bioreattore High Throughput sarà invece possibile effettuare colture cellulari, sottoponendole a regimi dinamici tipici dei tessuti in vivo, con un conseguente aumento dell'attendibilità degli esperimenti svolti.

Capitolo 1

L'importanza dei bioreattori nella ricerca.

Verso la fine degli anni '80, la comunità scientifica, forte delle nuove tecniche scoperte nel campo della coltura cellulare, e vista la scarsità di organi e tessuti disponibili per i trapianti, iniziò a coltivare in laboratorio tessuti umani da impiantare nei pazienti, come alternativa al trapianto omologo.

Nacque così la Tissue Engineering, nuova branca della ricerca medico biologica, finalizzata alla realizzazione di tessuti ingegnerizzati, atti alla sostituzione funzionale.

La definizione che la letteratura ci offre del Tissue Engineering è la seguente:

“Campo interdisciplinare che applica i principi dell'ingegneria e delle scienze biologiche allo scopo di sviluppare sostituti biologici per ripristinare mantenere o migliorare funzioni di tessuti o organi”. (1)

Nei primi anni di attività, numerose furono le aziende nate per realizzare o commercializzare i prodotti del futuro, i quali promettevano, a pazienti gravemente ustionati, guarigioni in tempi da record e senza cicatrici.

Non tutta la comunità scientifica però sfruttò il Tissue Engineering come tecnica produttiva atta alla realizzazione di sostituti funzionali; alcuni ricercatori iniziarono ad utilizzare questi tessuti come supporti per i test farmacologici e fisiologici. Nacque così un nuovo filone del

Tissue Engineering, atto alla realizzazione e coltivazione di tessuti, per il testing di svariate molecole e tecniche di laboratorio.

Ben presto iniziarono ad arrivare i primi report sull'attività delle aziende impegnate nella generazione dei tessuti da impiantare; ci si rese immediatamente conto che il settore del futuro era in realtà in forte crisi.

Questa crisi era dovuta soprattutto all'approccio tenuto da queste aziende nello studio delle varie tecniche di realizzazione dei tessuti. Tipicamente queste imprese adottavano un approccio di tipo *trial and error*. Forti dei successi iniziali, si illusero di poter produrre tessuti di alta qualità, utilizzando le tecniche classiche e apportando cambiamenti ogni qual volta si fosse presentato un fallimento.

Vista l'enorme complessità della materia, i fallimenti superarono i successi e, solo poche aziende, riuscirono ad individuare la giusta ricetta, iniziando così a vendere i propri prodotti.

Purtroppo però, anche questi nuovi prodotti non riscossero mai un enorme successo; i motivi di questo ulteriore fallimento sono svariati e vanno ricercati nelle singole realtà aziendali, anche se possono essere riassunti in pochi punti:

I pazienti che necessitavano dei nuovi prodotti costituivano una piccola fascia di mercato.

I risultati clinici delle nuove metodiche non erano così rilevanti da convincere i medici ad abbandonare le vecchie terapie.

Date le modeste unità prodotte, le procedure di fabbricazione presentavano costi eccessivamente alti.

Le procedure di approvazione da parte di enti, come la FDA, richiedevano costi elevati e tempi molto lunghi.

Le aziende non avevano previsto dei piani efficienti di rimborso clienti. (1)

Nel frattempo, i ricercatori che avevano scelto di utilizzare i tessuti come mezzi per i test farmacologici, iniziarono ad ottenere i primi risultati. I risultati ottenuti da quest'ultimi, però, non erano frutto di un processo *trial and error*, ma piuttosto di una lunga ed attenta analisi dei principi posti alla base della fisiologia cellulare e dei tessuti biologici.

Forti dell'esperienza acquisita in questi anni di studi, i ricercatori del ramo metabolico cellulare, fecero in breve tempo enormi passi avanti, ma furono costretti a rallentare per un ulteriore problema. La tecnologia del tempo non era stata al passo con la ricerca biologica e la comunità scientifica mancava, quindi, dei mezzi necessari per portare avanti il proprio lavoro di indagine sui tessuti ingegnerizzati. (2)

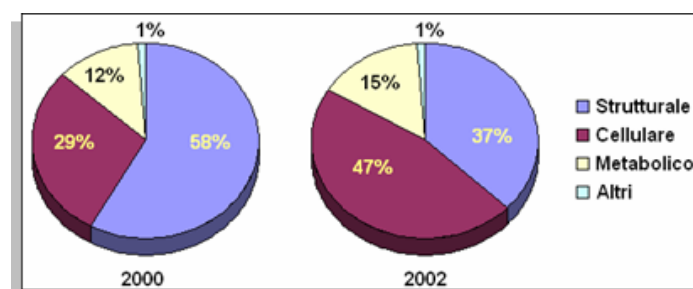


Figura 1-1: Andamento dei due settori fra il 2000 ed il 2002.

Dal grafico precedente possiamo osservare quanto appena affermato: dal 2000 al 2002 si osserva un incremento del Tissue Engineering con finalità metaboliche e cellulari (Tessuti epatici, renali, neuronali e colture cellulari per test) a discapito del Tissue Engineering strutturale, cioè quello relativo alla sostituzione funzionale di pelle, osso e cartilagine. (2)

Negli ultimi 5 anni non si è assistito, però, ad alcun tipo di cambiamento nelle tecniche di realizzazione ed analisi dei tessuti, non

perchè si sia raggiunto il top, ma piuttosto, perchè non esistono ancora mezzi e tecniche di coltura cellulare alternativi, capaci di assistere i ricercatori nel loro lavoro.

1.1 Il Bioreattore

Ultimamente molti ricercatori hanno iniziato ad osservare come, in realtà, sia scorretto e forse impossibile, estrapolare dalle colture cellulari, tipiche del tissue engineering, dati utili per la comprensione della fisiologia dei tessuti in vivo.

Le colture cellulari vengono infatti realizzate in ambiente statico, mediante l'utilizzo di appositi pozzetti in materiale plastico, riempiti con terreno di coltura. Il nutrimento delle cellule viene assicurato mediante un trasferimento di massa diffusivo, tra il terreno di coltura e la membrana cellulare. Il terreno viene sostituito ogni giorno, così da non privare i tessuti dei nutrienti, ed è ossigenato tenendolo a contatto con un'atmosfera controllata, composta da aria e CO₂ al 5%. Questa concentrazione di CO₂ fa sì che il valore del pH, nel terreno, rimanga tale da permettere una corretta sopravvivenza della coltura cellulare e quindi prossimo al valore 7,4.

È facile intuire, quindi, come questo approccio di coltivazione sia solamente un'approssimazione della realtà biologica, che le colture dovrebbero rappresentare. A differenza dei pozzetti, negli organismi viventi, il terreno di coltura è rappresentato dai fluidi biologici quali il sangue ed il liquido interstiziale. Questi liquidi non sempre presentano un'ossigenazione od una concentrazione di nutrienti ottimale per la crescita cellulare e spesso sono mossi da flussi convettivi che impongono sulle cellule shear stress molto elevati.

Questa differenza di variabili ambientali comporta inevitabilmente una differenza sulla fisiologia del tessuto in esame, che rende molto difficile l'utilizzo dei dati ottenuti dalle colture cellulari, in ambiente statico, per lo studio della fisiologia dei tessuti in vivo.

La comunità scientifica ha iniziato quindi a studiare sistemi di coltura cellulare in ambiente simulato, capaci di ricreare in vitro, le condizioni cui sono sottoposti i tessuti all'interno degli organismi, così da poter comprendere meglio i fenomeni posti alla base delle varie patologie

Questi sistemi, chiamati bioreattori, presentano però un forte handicap. Richiedono la presenza di un incubatore per poter mantenere il terreno di coltura a contatto con l'atmosfera di aria e CO₂. Risulta quindi impossibile, osservare le colture cellulari in modo continuo, sotto microscopio, così da poter meglio comprendere quali siano i cambiamenti indotti, nei tessuti in esame, dalle tecniche o dalle molecole utilizzate per i test.

Nel 2000, presso il Centro Interdipartimentale di Ricerca E.Piaggio, è stato sviluppato il primo prototipo di bioreattore capace di controllare pH, pressione, flusso e temperatura di una coltura cellulare.

Questo nuovo sistema di coltura cellulare consta fondamentalmente di una camera di trattamento, dove vengono fatte aderire le cellule e dove, mediante un particolare sistema di controllo, viene fatto passare del terreno di coltura opportunamente trattato.

Il bioreattore è in grado, quindi, di mantenere il pH e la pressione all'interno della camera di trattamento ad un valore prestabilito dall'utente, senza necessitare di un incubatore, e permettendo perciò, al ricercatore, di osservare, sotto microscopio, le evoluzioni della coltura cellulare in esame.

Questo sistema permette, quindi, di poter osservare in continuo quali siano gli effetti che determinate sostanze o procedure, inducono nei tessuti cellulari ed esportarli quindi all'uomo.

L'esportazione dei dati dalla coltura cellulare all'uomo è notevolmente facilitata. Infatti le colture cellulari vengono, tenute, dal bioreattore, in un ambiente avente condizioni simili a quelle fisiologiche. È possibile quindi simulare, ad esempio, profili di pressione pulsatile, come quelli dell'albero circolatorio, oppure shear stress alle pareti elevati, come nel tratto aortico ecc.

Il bioreattore in questione è stato testato durante questi anni, presso l'istituto di fisiologia Clinica del CNR di Pisa, ed è stato oggetto di numerose collaborazioni con diversi enti, quali il CTF di Pisa e l'Istituto di Neurofisiologia del CNR di Pisa.

Grazie a questo nuovo sistema di coltura cellulare, sarà quindi possibile fare il tanto atteso passo in avanti, che la ricerca sulla ingegneria tissutale attende da ormai una decina di anni.

1.2 La sperimentazione animale

La ricerca medico biologica odierna basa il proprio lavoro sulla sperimentazione animale. La profilassi classica in materia di approvazione di una determinata molecola, avente proprietà terapeutiche, prevede inevitabilmente la fase della sperimentazione animale e poi, successivamente, la sperimentazione umana.

Nel 1991, nella sola Europa, gli animali utilizzati per la ricerca sono stati 11.790.485; nel 1992, in Canada, sono stati impiegati 2.115.006 animali; negli USA, ogni anno, vengono uccisi 17 milioni di animali.

Si stima che, nel mondo intero, si arrivi ad almeno 300 milioni di esemplari uccisi ogni anno. (3)

Appurato che, al giorno d'oggi, la sperimentazione animale è un mezzo indispensabile per la ricerca, è dovere della comunità scientifica lavorare affinché si riesca a ridurre al minimo, il numero di cavie animali immolate.

Il concetto di alternativa alla sperimentazione animale risale alla definizione elaborata da Russel e Burch nel 1959 e comunemente definita delle 3R: *Refinement* (affinamento), *Reduction* (riduzione) e *Replacement* (sostituzione). Con affinamento si intende il miglioramento delle tecniche sperimentali, compiute pur sempre su animali, in modo da ridurre la loro sofferenza; con riduzione si intende la riduzione del numero di animali usati, o l'aumento di informazioni ottenute con lo stesso numero di animali; con sostituzione si intende proprio la sostituzione dell'animale con l'utilizzo di metodi alternativi.

A tal proposito, la direttiva europea 86/609/CEE in materia di "protezione degli animali utilizzati a fini sperimentali o ad altri fini scientifici", impone di sostituire o ridurre il più possibile il numero degli animali utilizzati.

L'articolo 7.2 afferma che:

"Un esperimento su un animale non dovrà essere eseguito se è disponibile un altro metodo scientificamente soddisfacente per ottenere il risultato cercato che non implichi l'uso di animali".

Inoltre, l'articolo 23.1 afferma che:

"La Commissione e gli Stati Membri dovrebbero incoraggiare la ricerca nello sviluppo e nella validazione di tecniche alternative, che possano fornire lo stesso livello di informazione ottenuto dagli"

esperimenti su animali, ma che utilizzino meno animali o che comportino procedure meno dolorose.” (4)

Ma quali sono i metodi alternativi?

La grande maggioranza degli esperimenti compiuti su animali sono test di “tossicità”, obbligatori per legge, cioè quei test che dovrebbero accertare la pericolosità di una data sostanza chimica per l'uomo.

Altri esperimenti sono quelli compiuti invece nella ricerca biomedica di base, per lo studio delle malattie; in questo caso non è obbligatorio per legge usare gli animali, anche se purtroppo sembra essere l'unica possibilità.

Il Tissue Engineering si inserisce perfettamente in questo contesto, permettendo di ridurre notevolmente la pratica della sperimentazione animale, fornendo strumenti alternativi per l'analisi della tossicità delle molecole.

È necessario, però, lavorare ulteriormente per riuscire a ridurre ancora di più il numero di cavie necessarie alla ricerca e, soprattutto, per trovare soluzioni alternative alla sperimentazione animale, per tutti quei farmaci non ritenuti salvavita, come ad esempio l'intero settore della cosmetica.

Per fare ciò è necessario dotare i nostri sistemi di coltura cellulare, di mezzi di estrazione dati altamente performanti, così da ridurre il numero di esperimenti necessari per l'estrazione dei dati, con conseguente riduzione del numero di cavie necessarie per i test.

Dotando i sistemi di coltura di opportuni sistemi di analisi in continuo, sarà possibile osservare costantemente le colture cellulari, così da meglio comprendere i diversi fenomeni di citotossicità indotti dalle

molecole e giungere, quindi, ad una più veloce comprensione dei fenomeni in esame.

1.3 La nostra proposta

Il bioreattore del Centro E.Piaggio si inserisce perfettamente in questo contesto, essendo quest'ultimo, a differenza delle classiche tecniche di coltura statica o dinamica in incubatore, un macchinario capace di permettere l'osservazione di colture cellulari sottoposte a determinati test o stimoli, in regime continuo e direttamente sotto microscopio.

Questo lavoro di tesi nasce dall'esigenza di trasformare il bioreattore in questione, da prototipo utilizzabile da un personale con determinate conoscenze informatico elettroniche, a macchinario commercializzabile, che possa essere utilizzato anche da personale del settore medico-biologico.

Un aspetto fondamentale del nuovo macchinario, è quello relativo all'inserimento, nel prodotto finito, della nuova metodologia di analisi di tipo High Throughput. Questa nuova metodologia di esame dà la possibilità di condurre esperimenti con sistemi e tecniche innovative, capaci di restituire all'utente, una grande mole di dati, in breve tempo e con un numero di test notevolmente ridotto.

Sarà possibile, infatti, mediante il nuovo bioreattore High Throughput, condurre più esperimenti in parallelo, su diversi campioni di tessuto, così da poter verificare come le diverse metodologie di trattamento o i diversi farmaci, possano o meno influenzare le colture cellulari, esportando quindi i dati ai tessuti biologici in vivo.

Per meglio comprendere quali siano le potenzialità di questo strumento, analizziamo ora un esempio di utilizzo del nuovo sistema bioreattore, che verrà sviluppato durante questo lavoro.

Immaginiamo di condurre un esperimento su quattro retine di topo, tenute in coltura da quattro diversi bioreattori. Ciascun bioreattore provvederà al mantenimento delle proprie condizioni fisiologiche, come in un vero organismo vivente, ma l'utente potrà decidere di simulare in uno di questi una patologia.

Se in uno dei quattro bioreattori decidessimo di innalzare la pressione di trattamento, otterremmo una simulazione di patologia, quale il glaucoma della retina. L'utente potrà confrontare i vari tessuti in contemporanea, così da poter verificare come la pressione induca, nei tessuti retinali, la formazione del glaucoma e dedurre quindi, una possibile strategia di cura.

I quattro bioreattori equivalgono alla simulazione di quattro organismi viventi, in uno dei quali è presente una patologia. Il sistema High Througput provvederà a monitorare e registrare i dati da tutti i bioreattori collegati; avremo quindi una sorta di laboratorio, dove effettuare testing farmacologico o patologico su cavie "virtuali", con conseguente riduzione del numero di animali necessari alla sperimentazione e, come analizzeremo in seguito, con una notevole riduzione dei costi di gestione.

Grazie a questo nuovo sistema, sarà possibile effettuare testing di tossicità o irritabilità su tessuti epiteliali, senza l'utilizzo di cavie, per tutte quelle molecole atte allo sviluppo di prodotti cosmetici, che ad oggi richiedono, purtroppo, un numero di cavie pari a quello dei farmaci salvavita.

Risulta molto efficiente, il sistema di coltura delle cellule epiteliali, realizzato presso il Centro E.Piaggio, grazie al quale sarà possibile testare i vari principi attivi dei prodotti cosmetici.

Nei capitoli successivi verrà effettuata un'analisi delle modifiche apportate al bioreattore sviluppato presso il Centro E.Piaggio al fine di trasformarlo in un vero e proprio mezzo di Testing Cellulare High Throughput. L'analisi sarà mirata inoltre, ad una futura commercializzazione del prodotto, al fine di poter fornire, alle aziende toccate dal problema, un'alternativa valida alla sperimentazione animale, nonché un mezzo altamente tecnologico di testing su tessuti cellulari.

Bibliografia

1. Ingegnerizzazione di microvasi per applicazioni nell'ingegneria tissutale. **Antonio Migliore** Pisa Facoltà di Ingegneria, 2006
2. Tissue Engineering: The End of the Beginning. **M. J. Lysaght, A.L. Hazlehurst.** Tissue Eng, 2004, Vol. 4;10
3. Le ragioni dell'antivivisezionismo. **Oltre la Specie.** .
<http://www.oltrelaspecie.org/vivisezione.htm>. [Online] 2006.
4. Vivisezione: le alternative. **Berati, Marina.**
<http://www.mclink.it/personal/MC3478/info/alter.htm>. [Online] agosto 2001.
5. Tissue Engineering. **R. Langer, J.P. Vacanti** Science, 1993, Vol. 260 920-6

Capitolo 2

L'High Throughput Screening

Nell'ambito delle telecomunicazioni, si intende per throughput di un canale di comunicazione, la sua capacità di trasmissione effettivamente utilizzata.

Il throughput non è da confondersi con la capacità del link: sia la capacità che il throughput si esprimono infatti in bit/s, ma, mentre la prima esprime la velocità massima alla quale i dati possono viaggiare, il throughput è un indice dell'effettivo utilizzo della capacità del link. Il throughput è quindi la quantità di dati trasmessi in un'unità di tempo.

Nell'ambito della biologia sperimentale la parola throughput è stata riutilizzata per indicare, mediante il termine "*High Throughput Screening*" (HTS), una modalità di sperimentazione atta all'estrazione di una grande quantità di dati da un unico esperimento e nel minor tempo possibile.

L'approccio classico utilizzato per i test in ambito biologico prevede, in genere, l'utilizzo di una serie di pozzetti dove viene inoculata una coltura cellulare. In ciascun pozzetto viene inserita, in seguito, una diversa molecola, oppure diverse concentrazioni della stessa (1).

Con l'avvento della robotica e dell'informatica, è stato possibile realizzare macchine capaci di automatizzare l'intero processo e di leggere, quindi, da questi pozzetti, dati con altissima velocità e precisione.

Un classico apparato di sperimentazione di tipo High Throughput Screening si basa, generalmente, sull'utilizzo dei *multi well*; questi

ultimi sono contenitori aventi al loro interno vari pozzetti, dove inserire liquidi, colture cellulari, soluzioni etc. Questi pozzetti vengono poi inseriti in un macchinario che, attraverso manipolatori robotici ed una serie di sistemi microfluidici, provvede all'inserimento, in ciascun pozzetto, di una determinata molecola da testare.



Figura 2-1: Multi well da 48 e 96 pozzetti.

Prima dell'avvento di queste nuove tecnologie, il ricercatore era costretto a seminare la stessa coltura cellulare in tutti i pozzetti dei multi well e, dopo, iniziare ad inoculare, in ognuno di questi, una diversa molecola di interesse, oppure diverse concentrazioni della stessa. Quindi si appuntava, sul coperchio del multi well, mediante un semplice pennarello indelebile, il contenuto dei singoli pozzetti. Infine,

dopo aver atteso il tempo necessario alla reazione, si procedeva con l'esecuzione dei test atti alla rilevazione degli effetti indotti dalla molecola.

Questo metodo di lavoro prevedeva tempi molto lunghi di esecuzione e, le numerose manipolazioni richieste ai multi well, aumentavano notevolmente il rischio di contaminazione della coltura. Inoltre, operazioni di tipo ricorsivo, come quelle previste dal procedimento descritto, portavano inevitabilmente ad un aumento della probabilità di errore da parte dell'operatore, con conseguente fallimento dell'esperimento o erronea interpretazione dei dati.

Un macchinario di tipo High Throughput Screening riesce ad eseguire tutto il procedimento in maniera del tutto automatica, sterile e sicura ed in un tempo legato solo ed esclusivamente a quello di reazione dei reagenti o di incubazione delle colture.(3)

2.1 Utilizzi odierni dell'HTS

Uno dei campi dove l'High Throughput Screening ha riscontrato maggior successo, è quello dell'analisi immunologica; in ogni distretto ospedaliero, infatti, è presente un reparto analisi dove pervengono, ogni giorno, una notevole quantità di provette contenenti campioni di sangue, appartenenti a diversi soggetti.

Fino a qualche anno fa, queste provette venivano catalogate e suddivise fra i vari ricercatori del laboratorio, che provvedevano ad effettuare tutti i test richiesti dal medico, oppure, in caso di sospetta infezione batterica, si procedeva con una serie di test atti all'individuazione del batterio provocante l'infezione.

Una volta individuato il batterio, era necessario dover eseguire, sul campione di sangue infetto, tutta un'altra serie di test, al fine di individuare l'antibiotico più adatto e la concentrazione minima necessaria per il debellamento dell'infezione.

Oggi, tutto ciò, avviene in modo completamente automatizzato; i campioni di sangue prelevati dai pazienti vengono, infatti, catalogati mediante un sistema di codici a barre, che identifica univocabilmente il campione e lo associa alla cartella del paziente. Dopo essere stati catalogati, elettronicamente, i campioni vengono inseriti in un incubatore, che li mantiene in agitazione in un'atmosfera ottimale per la crescita batterica e ad una temperatura di circa 38°C.

All'interno di ciascuna provetta, è inserito un sensore di CO₂, che permette all'incubatore di monitorare la quantità di CO₂ sviluppata nel tempo all'interno di essa. La sintesi proteica dei batteri contenuti nel sangue, infatti, fa sì che le colture infette producano una quantità di CO₂ notevolmente superiore rispetto alle colture sane.

Se in una provetta viene rilevata una produzione di CO₂ superiore alla norma, viene allertato l'operatore che, prelevata la provetta, inizierà i test per il riconoscimento del batterio provocante l'infezione.

Questi test, ad oggi, vengono effettuati mediante l'utilizzo di pannelli chiamati *Pannel Card*. Questi pannelli hanno l'aspetto di una carta di credito e contengono al loro interno fino a 96 pozzetti, dove sono inserite, in fase di fabbricazione, diverse molecole, terreni etc.

Mediante un sistema microfluidico interno al pannello una macchina incola parte della coltura di sangue e batteri nei vari pozzetti, il tutto in modo sterile e con particolare attenzione alla sicurezza dell'operatore.

Quest'ultimo, infatti, non entra mai in contatto con il sangue del paziente ed il pannello viene sigillato prima della fuoriuscita dalla macchina.

I pannelli vengono tenuti dalla macchina in un ambiente a temperatura controllata, così da non uccidere i batteri per shock termico e, dopo un tempo necessario alla metabolizzazione delle molecole preinserite nei pozzetti, la macchina effettua uno screening di questi, mediante un sistema di lettura colorimetrico.

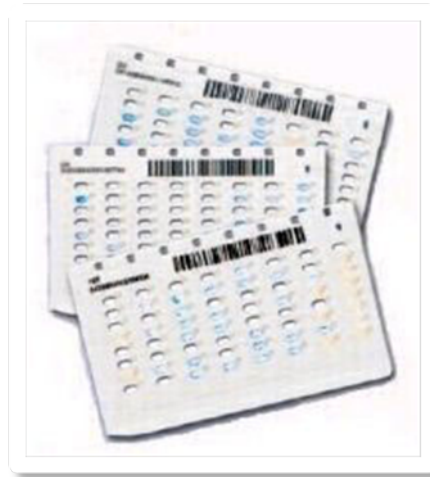


Figura 2-2: Pannelli Vitek 2. (3)

Si ottiene, così, una specie di carta di identità del batterio infestante il paziente e si può così procedere alla scelta dell'antibiotico migliore per la cura.

Anche questa fase avviene in modo automatico mediante pannelli detti antibiogramma. Esistono infatti una serie di pannelli contenenti ciascuno una diversa famiglia di antibiotici e con diverse concentrazioni al loro interno. Questi forniscono così, all'operatore, informazioni riguardo alla molecola di maggior efficacia e, soprattutto, la concentrazione minima inibente la coltura.

Tutta questa serie di esperimenti, che fino a 10 anni fa richiedeva anche una settimana di tempo, oggi viene effettuata, nei casi più difficili, in 48 ore.

E' quindi possibile, in sole 48 ore, poter iniziare sul paziente una cura antibiotica mirata, con conseguente riduzione dei costi sanitari relativi ad eventuali ricoveri ecc. Inoltre non bisogna dimenticare il costo umano, in quanto, un paziente curato dopo 48 ore, avrà maggiori possibilità di superare indenne l'infezione rispetto ad uno curato dopo una settimana. (4)

Esistono, inoltre, sistemi simili utilizzati per le classiche analisi di laboratorio che, utilizzando pannelli anch'essi in lettura colorimetrica, danno informazioni relative alle concentrazioni dei vari metaboliti contenuti nel sangue.

Inoltre queste tecnologie hanno contribuito ad un aumento della sicurezza nei laboratori. Gli operatori, infatti, non devono più entrare in contatto con campioni di sangue infetto, evitando così il rischio di contaminazione.

Un altro esempio di High Throughput Screening è l'utilizzo dei cosiddetti *DNA Chip Micro Array*. Questi nuovi sistemi di indagine genetica sono dei piccoli supporti rigidi dove, in fase di fabbricazione, vengono legati dei frammenti di DNA di una particolare specie.

Questi sistemi permettono ai ricercatori di investigare sulle diverse espressioni geniche di malattie, sindromi o semplicemente attività metaboliche di cellule, sia eucariote che procariote.

Fino a qualche anno fa, per effettuare uno screening atto all'individuazione delle diverse espressioni geniche, per esempio in cellule infettate e non, era necessario condurre un esperimento per

ciascun frammento di DNA conosciuto, utilizzando quindi procedure e reagenti specifici per ciascun frammento.

Con i Dna Micro Array, è possibile inserire su un unico array fino a 96 frammenti di DNA, con un conseguente risparmio di tempo e risorse.

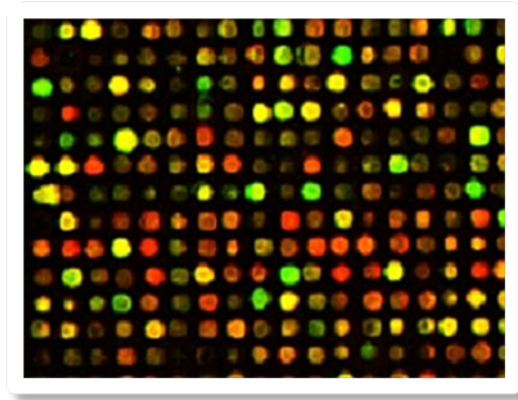


Figura 2-3: Esempio di risultato da Dna Micro Array.

2.2 L'High Throughput ed i bioreattori

Negli ultimi anni, le metodologie High Throughput si sono prefissate tre obiettivi:

Incremento della quantità di dati estraibili da un esperimento.

Riduzione dei tempi necessari allo svolgimento dei test.

Miniaturizzazione dei dispositivi.

Analizzando nel dettaglio le metodiche di indagine High Throughput, si può facilmente notare, però, come questa tecnologia, in molti casi, tenda a limitare le proprie capacità. Questo apparente paradosso è chiaramente osservabile nell'utilizzo di metodiche High Throughput per lo studio delle colture cellulari, dove i multiwell a 96 pozzetti o le fiasche agitate, sono utilizzati come mezzi per la crescita delle colture cellulari o il testing dei terreni di coltura.

Possiamo infatti affermare che, nella migliore delle ipotesi, questi sistemi di coltura cellulare, siano in realtà delle crude approssimazioni

di bioreattori, e restituiscano quindi informazioni spesso difficilmente scalabili, e di conseguenza, non molto attendibili dal punto di vista fisiologico.(5)

Dalle colture in pozzetto, è possibile estrarre valide informazioni riguardo ai comportamenti macroscopici dei tessuti biologici come, per esempio, le risposte ad alcuni farmaci o trattamenti. Non potremmo però fidarci di questi sistemi per l'individuazione dei dosaggi che tali molecole richiedono o dei tempi necessari per un determinato trattamento.

Questa differenza di comportamento fra le colture in ambiente statico e i tessuti di un sistema biologico vivo, è legata alle diverse condizioni ambientali che vi sono tra una coltura in statico ed un tessuto posto nel suo luogo "naturale". La notevole differenza delle variabili ambientali quali: pressione, flusso, gradienti di concentrazione ecc, porta inevitabilmente ad un cambiamento dei sistemi fisico metabolici, caratteristici dei tessuti in esame, comportando quindi una notevole discrepanza fra i dati rilevati in statico e quelli rilevabili in vivo.

Prendiamo, ad esempio, le colture di cellule endoteliali, effettuate per i test sulla formazione dell'epitelio finestrato e del rilascio dei fattori di crescita ed organizzazione di quest'ultimo.

Pensare di effettuare esperimenti su un monolayer di cellule endoteliali, al fine di rilevare dati attendibili per lo studio dell'angiogenesi e della vascolarizzazione, è un approccio del tutto discutibile. E' stato dimostrato, infatti, che le cellule endoteliali tendono a rilasciare particolari fattori di crescita se sottoposte a shear stress, come in presenza dei flussi arteriosi presenti all'interno dell'albero circolatorio.

Questi fattori di crescita guidano l'organizzazione cellulare interagendo quindi con la fisiologia del tessuto. Test condotti in ambiente statico porteranno pertanto a risultati notevolmente differenti da quelli condotti in un ambiente dove sia possibile ricreare uno shear stress. (6)

I dati estrapolati da questi tipi di colture, in assenza dei corretti stimoli, serviranno quindi a solo titolo discriminativo, non essendo direttamente riconducibili alle condizioni realmente presenti in vivo.

Con questo non si vuol certo affermare che tutti i test eseguiti in ambiente statico siano inutili, ma piuttosto quanto sia necessario iniziare ad utilizzare queste nuove metodologie di coltura cellulare in ambiente simulato, per meglio comprendere i fenomeni legati alla fisiologia del nostro organismo.

E' intuibile, quindi, quali sarebbero le potenzialità di un sistema capace di effettuare test di tipo High Throughput su colture cellulari poste in un ambiente simulante la condizione in vivo.

Oggi tutto questo è possibile, grazie ai progressi fatti nel campo dei bioreattori, essendo questi ultimi, sistemi capaci di ricreare condizioni ambientali simili a quelle presenti nei tessuti in vivo, quali, per esempio, pressione, flusso, gradienti di concentrazione, ecc.

Fino ad oggi non esistevano, però, bioreattori capaci di mantenere in vita colture cellulari, sottoponendole a stimoli biosimili per periodi di tempo prolungato e, soprattutto, senza l'utilizzo di un incubatore. Di conseguenza, dotare queste apparecchiature di sistemi di analisi dei dati in modalità High Throughput, poteva risultare inutile.

Visti, però, gli ottimi risultati ottenuti dal bioreattore del Centro Interdipartimentale di Ricerca E.Piaggio durante questi anni di test

presso il CNR di Pisa, si è pensato di ottimizzare quest'ultimo, al fine di renderlo un vero e proprio mezzo di coltura cellulare High Throughput.

Questo bioreattore è capace di mantenere in coltura tessuti cellulari di svariato tipo, per lunghi periodi di tempo e senza la necessità di dover inserire l'intero sistema all'interno di un incubatore. E' quindi possibile osservare, sotto microscopio, l'evoluzione delle colture cellulari sottoposte a trattamento, per l'intera durata dell'esperimento.

2.3 Rendere un Bioreattore High Throughput

Un bioreattore è un macchinario capace di mantenere in vita, all'interno di una particolare camera, chiamata cella di trattamento, dei tessuti cellulari per numerosi giorni.

Questo sistema è generalmente composto da:

- Un sistema di regolazione delle variabili ambientali (pi, Temperatura, percentuale di O₂ e CO₂, Velocità del flusso di terreno).

- Una pompa per la circolazione del terreno.

- Un riscaldatore.

- Vari Sensori e relativi sistemi di lettura.

Il sistema, mediante il controllo di alcuni parametri, tenta di mantenere le variabili ambientali a livelli ottimali per la crescita e la sopravvivenza del tessuto in esame. Grazie al monitoraggio delle variabili, l'operatore ha la possibilità di osservare l'andamento della coltura cellulare e dedurre, pertanto, gli effetti che, eventuali trattamenti o somministrazioni, hanno sulla coltura in esame.

Il sistema così concepito riesce, quindi, ad analizzare un solo tessuto, sottoponendolo però ad una serie di stimoli simili a quelli presenti all'interno di un organismo.

L'approccio High Throughput prevede, però, che si riesca ad estrarre, con un solo macchinario ed un unico esperimento, numerosi dati analizzando contemporaneamente piccole porzioni di tessuto, sottoposte a diverse condizioni o stimoli.

Per fare ciò, il bioreattore del Centro E.Piaggio è stato equipaggiato, negli scorsi anni, di una camera di coltura cellulare a gradiente di concentrazione, capace di coltivare un tessuto in presenza di un gradiente di concentrazione. Questo gradiente è generato a partire da due diverse diluizioni della molecola di interesse nel terreno di coltura; la camera di trattamento provvede, poi, alla realizzazione di un gradiente, che ha come minimo e massimo le due diluizioni scelte.

Con questo approccio è possibile, quindi, osservare come le diverse concentrazioni della molecola in esame, inducano effetti diversi sulle colture cellulari; la camera di miscelazione a gradiente di concentrazione consente, infatti, date le due diluizioni in ingresso, di conoscere punto per punto la concentrazione a cui la porzione di coltura in esame è sottoposta.

L'intera struttura può essere inserita sotto microscopio, così da permettere una registrazione in continuo della coltura, e poter osservare, quindi, come il trattamento induca nel tempo effetti dipendenti dalla diverse concentrazioni presenti in cella.

Questo approccio permette, quindi, di avere una metodologia di indagine del tutto simile a quella condotta nei pozzetti multiwell, dove

vengono sottoposti vari monolayer di tessuto a diverse concentrazioni della stessa molecola.

Con il bioreattore del Centro E.Piaggio è possibile, fare tutto ciò pur mantenendo le colture in un ambiente fornito di stimoli biosimili, e con la possibilità di riprendere o fotografare la coltura sottoposta a trattamento nella sua evoluzione.

La camera a gradiente di concentrazione è stata utilizzata, ad esempio, per l'individuazione della concentrazione di H_2O_2 , necessaria ad indurre apoptosi in colture aderenti di cellule endoteliali HUVEC. Successive analisi dei dati hanno dimostrato come vi sia una congruenza con i dati estratti da colture in multi well, ma le concentrazioni in gioco si sono rilevate essere abbastanza differenti. Questo fenomeno è dovuto alla presenza del flusso di terreno che comporta, quindi, notevoli cambiamenti nei fenomeni diffusivi presenti all'interfaccia terreno–membrana cellulare, si passa, infatti, da un sistema puramente diffusivo, ad uno diffusivo–convettivo.

A tal proposito è bene sottolineare come spesso, in ingegneria tissutale, per migliorare il sistema di trasferimento di massa all'interfaccia cellula-terreno, si utilizzino le note fiasche agitate. Le fiasche agitate si limitano, però, ad un'agitazione del terreno di tipo turbolento e caotico, mentre, nel bioreattore, il flusso a cui sono sottoposte le cellule è di tipo laminare, monodirezionale e soprattutto di intensità controllabile dall'utente.

Nei successivi capitoli analizzeremo, pertanto, le varie modifiche apportate al bioreattore sviluppato presso il Centro interdipartimentale di Ricerca E.Piaggio, al fine di renderlo un sistema di High Throughput Screening in ambiente bio-simile. Questo sistema sarà in grado, di

effettuare esperimenti in modalità High Throughput, non solo con la cella a gradiente di concentrazione, ma con qualsiasi cella di coltura ad esso collegata.

Verranno, infatti, inseriti nuovi sistemi di controllo che permetteranno di controllare più bioreattori contemporaneamente, così da poter realizzare un vero e proprio laboratorio, dove effettuare esperimenti su diverse cavie virtuali.

Bibliografia

- 1.Throughput. **Wikipedia** <http://it.wikipedia.org/>. [Online] 2006.
- 2.Quality Chromatography & Life Science products **Cobertassoc.**
www.cobertassoc.com. [Online] 2006.
- 3.High-throughput screening. **Wikipedia** [Online] 2006.
- 4.Vitek 2. **Biomerieux** www.biomerieux.com. [Online] 2006.
5. High-Throughput Cell Culture: A Real-World Evaluation. **Tingley, Stephen K.**
BioProcessors Corporation, February 2006

Capitolo 3

Il bioreattore attuale e i propri limiti

Presso il Centro Interdipartimentale di ricerca Enrico Piaggio, nel 2000, è stato realizzato il primo prototipo definitivo di bioreattore, capace di controllare: pH, pressione, temperatura e flusso. Questo primo prototipo nasce da anni di studi condotti nel campo del Tissue Engineering, che hanno permesso, ai ricercatori del Centro E.Piaggio, di poter comprendere quali siano le caratteristiche fondamentali che debba avere un sistema di coltivazione cellulare.

Questi esperimenti hanno inoltre permesso di individuare quale sia la strategia di controllo più adatta per questo tipo di apparati e, soprattutto, hanno fornito le basi per la scelta dei componenti da utilizzare per la realizzazione di questo tipo di apparecchiature.

Questo nuovo bioreattore si differenzia dagli altri in commercio, per la possibilità di essere utilizzato all'esterno di un incubatore; tutti gli altri bioreattori, infatti, sono costituiti da sistemi capaci di tenere le cellule in coltura a diretto contatto con il terreno; quest'ultimo può essere: in regime statico, agitato o in moto laminare.

In questi bioreattori, però, il controllo delle variabili ambientali, quali temperatura, pressione, pH e percentuale di aria/CO₂, sono ottenuti mediante l'inserimento dell'intero sistema all'interno di un incubatore. Grazie alla realizzazione di questo nuovo apparecchio, è quindi possibile effettuare esperimenti senza l'utilizzo di incubatori, con la possibilità di osservare sotto microscopio le evoluzioni della coltura

cellulare in esame. Eliminando l'incubatore, si ha inoltre un notevole risparmio di denaro e di spazio utile all'interno del laboratorio.

Il Bioreattore in esame è costituito da alcune parti fondamentali:

- Camera di miscelazione del terreno di cultura.
- Hardware di controllo elettrovalvole e lettura sensori.
- Bagnetto termostatico.
- PC con scheda National Instruments.
- Camera di trattamento cellulare.
- Pompa peristaltica.

Analizzeremo ora in dettaglio le varie parti che compongono il sistema, valutandone i limiti riscontrati durante questi anni di utilizzo presso l'Istituto di Fisiologia Clinica del CNR di Pisa.

3.1 La camera di miscelazione

Questa unità permette di modificare e controllare i principali parametri chimici e fisici del sistema: pH del terreno, pressione all'interno del dispositivo e temperatura di trattamento. In questa cella viene immesso il terreno nella fase di avvio del bioreattore e, in essa, affluiscono tutte le connessioni del bioreattore che analizzeremo dettagliatamente in seguito.

La camera di miscelazione, separando la zona di trattamento da quella di miscelazione ed ossigenazione del terreno, permette di evitare danni alle cellule dovuti al collassamento delle bolle di gas. Quando le bolle collassano in prossimità di cellule, queste, se intrappolate, vengono sottoposte a stress molto elevati, sufficienti a provocarne la rottura della membrana.

La camera di miscelazione è composta da un semplice barattolo in Pirex sterilizzabile da 100 ml; per ridurre le dimensioni interne, parte del volume è stato riempito con un molding di PDMS, grazie al quale è stata ricavata una zona conica per l'alloggiamento del pH-metro.

Tale barattolo viene chiuso tramite un tappo in silicone in cui sono stati praticati dei fori per permettere l'immissione del pH-metro, di due connettori in vetro per l'ingresso e l'uscita del terreno di coltura, di un ago cannula per l'immissione di aria o CO₂ e di un connettore in vetro per la fuoriuscita dei gas.



Figura 3-1: La camera di miscelazione.

Per mantenere il terreno alla temperatura desiderata, è stata realizzata, con un tubo di silicone connesso al bagnetto termostatico, una serpentina in cui scorre acqua calda e che, avvolta intorno alla camera di miscelazione, assicura il mantenimento della temperatura del terreno.

Nella fase di riempimento vengono inseriti, in questa camera, circa 20 ml di terreno che, insieme al volume contenuto nei tubi di connessione del sistema, vanno a costituire l'intero volume di terreno del sistema bioreattore.

Analizziamo ora quali sono i problemi riscontrati da questo componente del bioreattore durante i test.

Dall'utilizzo della camera di miscelazione, si nota subito come l'efficienza del sistema di riscaldamento a serpentina sia bassa. La conduzione termica tra acqua, vetro e silicone è infatti molto bassa, comportando un insufficiente riscaldamento del terreno contenuto nella camera di miscelazione. Per ovviare a questo problema, durante i vari test, si è dovuto inserire la camera di miscelazione direttamente nel bagnetto termostatico, così da ottenere un corretto riscaldamento del terreno.

Questo comporta, però, molti problemi dal punto di vista dell'organizzazione del laboratorio; si è infatti obbligati a tenere il bagnetto termostatico sul piano di lavoro del bioreattore, con un notevole ingombro. Inoltre, in questo modo, la camera di miscelazione diventa difficilmente osservabile ed, eventuali perdite di terreno o gas, possono pertanto non essere individuate. Si rischia così un calo di pressione o del livello del terreno che può, di conseguenza, compromettere la buona riuscita dell'esperimento.



Figura 3-2: La camera di miscelazione inserita nel bagnetto.

Un'altro problema immediatamente riscontrabile, è l'inadeguatezza del barattolo in Pirex a tale scopo. Il suo volume, infatti, è stato ridotto con un riempimento di silicone biocompatibile, al fine di risparmiare sulle quantità di terreno necessarie per l'esperimento; tuttavia, pur con questo accorgimento, è necessario inserire circa 20 ml di terreno nella sola camera di miscelazione. Questa quantità, se sommata al volume di terreno contenuto nei tubi di connessione del sistema, porta il bioreattore a necessitare, per un riempimento, di circa 30 ml di terreno. La quantità di terreno necessaria, risulta però eccessiva per tutte quelle tipologie di esperimento che richiedano l'analisi di particolari metaboliti cellulari, in quanto, visto l'eccessivo volume, c'è il rischio che le concentrazioni in esame risultino troppo basse per essere rilevate con gli appositi kit.

Altro problema di questo componente del bioreattore, sono le cannule in vetro utilizzate per i collegamenti; queste risultano molto fragili e si rischia pertanto di romperle durante la chiusura della camera di miscelazione. La rottura delle cannule può comportare inquinamenti del terreno di coltura e l'impossibilità di avviare l'esperimento in tempi brevi. E' bene sottolineare, infatti, come i tempi di manipolazione dei componenti del bioreattore siano molto ridotti, in quanto non è possibile tenere per lunghi periodi di tempo le colture cellulari fuori dal sistema, o con il sistema spento. Senza un corretto apporto di ossigeno e nutrienti infatti, queste tendono a morire, o deteriorarsi molto velocemente. Inoltre, l'apertura del sistema in ambienti non sterili, comporta un alto rischio di infezioni della coltura.

3.2 L'hardware di controllo elettrovalvole e lettura sensori.

Tale unità permette di acquisire i segnali provenienti dai vari sensori, quali pH-metro, sensore di pressione, sensore di temperatura e flussimetro. Amplifica e filtra inoltre i segnali rilevati, al fine di renderli analizzabili dalla scheda di acquisizione dati, presente nel calcolatore connesso al dispositivo.

I sensori connessi al circuito sono:

- Un sensore di pressione (RS Gauge 286-658), collegato tramite una connessione a T sul connettore di fuoriuscita dei gas, che può monitorare la pressione all'interno del bioreattore.
- Un pH-metro Hamilton, che viene immesso nella camera di miscelazione a contatto con il terreno di coltura.
- Un sensore di flusso (Honeywell, Micro Switch AWM3000) per misurare la quantità di gas immesso nella camera di miscelazione del terreno.
- Un sensore di temperatura NTC miniaturizzato, collegato tramite un connettore a T all'ingresso della cella di flusso laminare, per monitorare la temperatura all'ingresso della cella, oppure collocato sopra il coperchio di vetro della camera di trattamento.

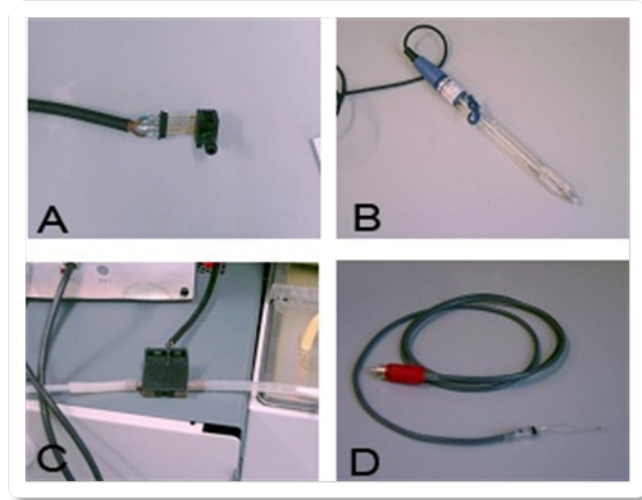


Figura 3-3: A Sensore di pressione, B pH-metro, C Sensore di flusso, D Sensore di temperatura.

In questo blocco è presente anche la parte di gestione delle alimentazioni, capace di fornire diversi voltaggi, al fine di alimentare correttamente la parte elettronica, le elettrovalvole e il regolatore di pressione. Sono presenti, infine, le due elettrovalvole e il regolatore di pressione elettronico (ITV 2000). Quest'ultimo componente permette di imporre una pressione al gas entrante nella camera di miscelazione, mediante un controllo in tensione; le due elettrovalvole invece, connesse agli ingressi dell'aria e della CO₂, vengono azionate per la selezione del gas da inviare alla camera di miscelazione e hanno un funzionamento di tipo On/Off.

Si può sin da subito intuire come questa parte sia il vero cuore del sistema di controllo del bioreattore; grazie a questo sistema di miscelazione dei gas e regolazione della pressione, è infatti possibile effettuare il controllo del pH e poter eseguire esperimenti a diverse pressioni di lavoro.

Il controllo del pH è basato sul principio che la diffusione di ossigeno in mezzo liquido a base acquosa, quale il terreno di coltura, comporta

un innalzamento del pH, mentre l'immissione di anidride carbonica tende ad abbassarlo per la presenza nel terreno di coltura di un tampone fosfato CO_2 dipendente.

Per problemi legati all'alta infiammabilità dell'ossigeno puro, al bioreattore viene fornita aria compressa opportunamente filtrata, che si è visto essere comunque in grado di innalzare il pH, se pur in tempi più lunghi.



Figura 3-4: Hardware controllo elettrovalvole e lettura sensori.

Uno dei problemi rilevati durante l'utilizzo di questo sistema, è quello dovuto alla maggiore solubilità in acqua della CO_2 rispetto all'aria. Per questo motivo l'inserzione di anidride carbonica avviene per intervalli di tempo inferiori a mezzo secondo e il flusso in ingresso è quasi sempre costituito da aria.

Pur essendo molto miscibile, l'anidride carbonica comporta un abbassamento del pH con una cinetica discretamente lenta; questo rende impossibile effettuare un controllo del pH di semplice tipo On/Off in feedback. Se pensassimo infatti di inserire CO_2 fin quando il valore del pH non fosse tornato al livello desiderato, si osserverebbe una continua discesa del pH anche dopo aver ricominciato ad inserire aria. Questa differenza di miscibilità e di cinetica complica

notevolmente l'algoritmo di controllo che sostanzialmente procede in modo iterativo fornendo impulsi di anidride carbonica, quando il pH è troppo alto e aspettando un tempo t , necessario all'azione della CO_2 , prima di decidere se inviare o no un nuovo impulso di CO_2 (1).

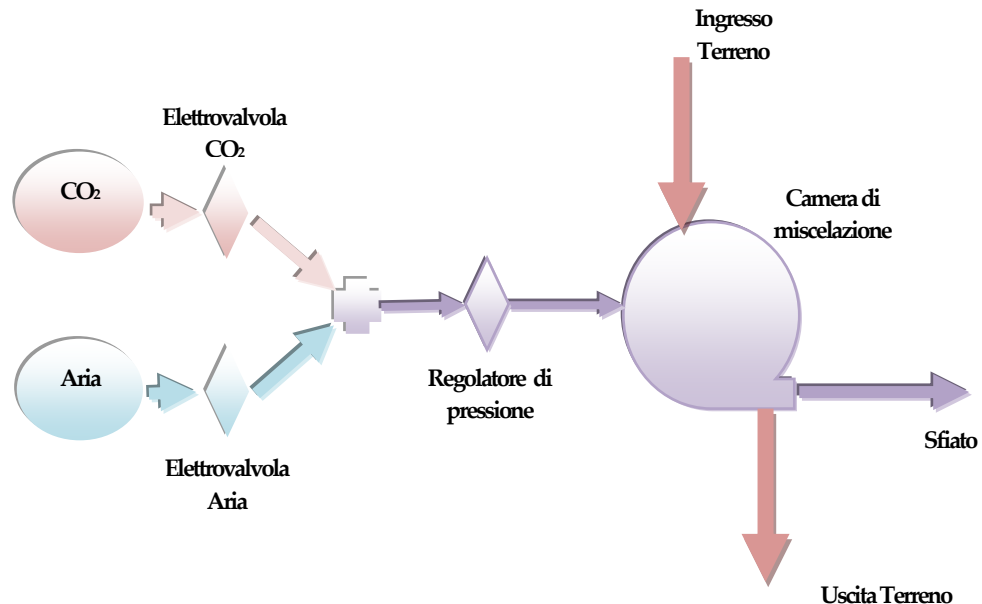


Figura 3-5: Schema immissione Gas.

3.3 La scheda National Instruments ed il PC

Quando iniziarono gli esperimenti per la realizzazione del bioreattore, si iniziò collegando i vari sensori ed attuatori ad una scheda National Instruments; in questo modo si poté condurre tutti gli esperimenti senza dover realizzare una scheda di acquisizione dedicata e, soprattutto, usufruendo del software di acquisizione segnali fornito con la scheda.

La scheda utilizzata per il collegamento del PC al bioreattore, è una National PCI capace di effettuare 200 campionamenti al secondo, ed avente 16 ingressi analogici, 2 uscite analogiche (tensione) e 8 porte In/Out Digitali.

La scheda è installata in uno slot PCI di un PC desktop, avente una configurazione standard. La National Instruments fornisce, con la scheda, i driver corredati da un tool di sviluppo ed acquisizione dati.

Durante questo lavoro di tesi, al fine di rendere più agibili le fasi di test preliminari, si è provveduto alla sostituzione della scheda National PCI, con un'altra avente caratteristiche equivalenti ma collegamento USB, in modo da poter utilizzare il bioreattore anche con dei notebook.

Per fare ciò è stato necessario adeguare il software di controllo del bioreattore, al fine di renderlo compatibile con il nuovo driver National USB¹.

Da una prima analisi del sistema PC-Scheda, si evince immediatamente come l'utilizzo di una scheda PCI limiti notevolmente le potenzialità e la maneggevolezza del bioreattore, in quanto è necessaria la presenza di un PC dedicato. Inoltre è da notare l'elevato prezzo di queste schede: la National Instruments PCI 6035 è venduta in Italia a 1049, mentre il modello USB è venduto a 1249 €².

Queste schede hanno un prezzo così elevato perché sono studiate per l'analisi di segnali molto particolari, integrando quindi tutti i sistemi di reiezione del rumore e condizionamento del segnale.

Nel caso di un bioreattore, tutto ciò può essere tranquillamente eliminato, in quanto i sensori utilizzati sono commerciali e, pertanto, forniscono in uscita segnali facilmente analizzabili e direttamente leggibili da semplici convertitori analogico digitale, mediante schede elettroniche di amplificazione facilmente realizzabili. E' da evidenziare inoltre, come l'elettronica di collegamento dei sensori sia già stata

¹ L'adeguamento del software ai driver USB è stato scritto con la collaborazione di Luigi Troiano.

² Fonte: National Instruments WebSite
(<http://digital.ni.com/worldwide/italy.nsf/main?readform>).

progettata con numerose accortezze per quanto riguarda la reiezione del rumore, e sia già contenuta nel blocco di controllo elettrovalvole.

L'elettronica di elaborazione dei segnali, contenuta nel blocco elettrovalvole, ha dimostrato, durante questi anni di test, di funzionare in modo corretto e funzionale, anche se è stata purtroppo concepita per un collegamento diretto con la scheda National Instruments. Dal circuito di elaborazione dei segnali escono, infatti, segnali in tensione, aventi una dinamica compresa nell'intervallo ± 12 Volt. Questo si è rivelato essere un notevole problema, in quanto limita la lettura dei segnali alle sole schede di acquisizione dati stile National Instruments, e rende invece impossibile l'utilizzo dei convertitori Analogico/Digitale presenti a bordo di numerosi microcontrollori.

I microcontrollori, infatti, riescono a misurare solo tensioni in ingresso comprese nell'intervallo $0-V_{cc}$, dove per V_{cc} si intende la tensione di alimentazione del controllore stesso. Questo aspetto rende purtroppo molto limitato l'utilizzo del bioreattore, che è attualmente vincolato ad un collegamento con una scheda da analisi di segnali; inoltre grava notevolmente sui costi di installazione dell'apparato, in quanto questa tipologia di schede risulta avere prezzi molto elevati.

Una delle caratteristiche che rende le schede National Instruments molto costose è, per esempio, la loro alta frequenza di campionamento che, nel caso di un bioreattore, è assolutamente non necessaria in quanto, viste le dinamiche tipiche dei fenomeni biologici, un campionamento di 10 volte per secondo è pienamente sufficiente. Si dimostra quindi, come allo stato attuale, finita la fase di progettazione e testing del sistema, risulti obsoleto il collegamento al bioreattore di una scheda di acquisizione dati di questo tipo.

Un ulteriore problema del sistema PC-scheda, è dato dall'impossibilità di disconnettere il sistema dal PC durante le fasi di lavoro, in quanto il controllo è effettuato direttamente dal software Visual Basic presente sul PC. Questo comporta notevoli problemi, dal momento che è necessario assicurare, sia al sistema bioreattore che al PC, una fonte di energia protetta e assicurata anche in caso di interruzione della linea elettrica; senza dimenticare che il sistema così concepito necessita di un PC dedicato.

3.4 Limiti software

Il software di controllo del bioreattore è stato scritto in Visual Basic durante un precedente lavoro di tesi e consta di un interfaccia grafica, mediante la quale è possibile imporre i valori di pH, pressione e portata e leggere i dati provenienti dai sensori. Il software effettua un controllo del pH aprendo le elettrovalvole della CO₂ e dell'aria, e regola i giri della pompa peristaltica mediante comunicazione seriale. Nel frattempo mostra in tempo reale i grafici di flusso, portata, temperatura e pH, con una frequenza di aggiornamento di circa una volta al secondo.

L'algoritmo di controllo del pH è la parte più delicata dell'intero sistema e lavora nel modo seguente:

1. Inizialmente viene fatta gorgogliare aria nella camera di miscelazione.
2. Raggiunta una soglia pari a 0.05 unità di pH sopra il valore imposto, si immette CO₂.
3. La CO₂ viene fatta gorgogliare per un tempo t necessario ad abbassare il pH di una quantità prestabilita.

4. Terminato l'impulso di anidride carbonica, viene nuovamente inviata aria in cella.
5. Si riparte dal punto 2. (2)

Il tempo ottimale di immissione CO_2 è stato valutato a partire da modelli cinetico-chimici del fenomeno di diffusione dell'anidride carbonica in terreno di coltura. Sono stati effettuati numerosi esperimenti, al fine di valutare i corretti tempi di immissione, tali da comportare una variazione di pH nota. Questi tempi risultano essere notevolmente variabili, e dipendono strettamente dalle condizioni in cella. I dati ottenuti sono stati tabulati ed inseriti nell'algoritmo di controllo. Il software è quindi in grado di selezionare il tempo di immissione CO_2 più adatto alla situazione, che in genere si aggira intorno agli 0,5 secondi.

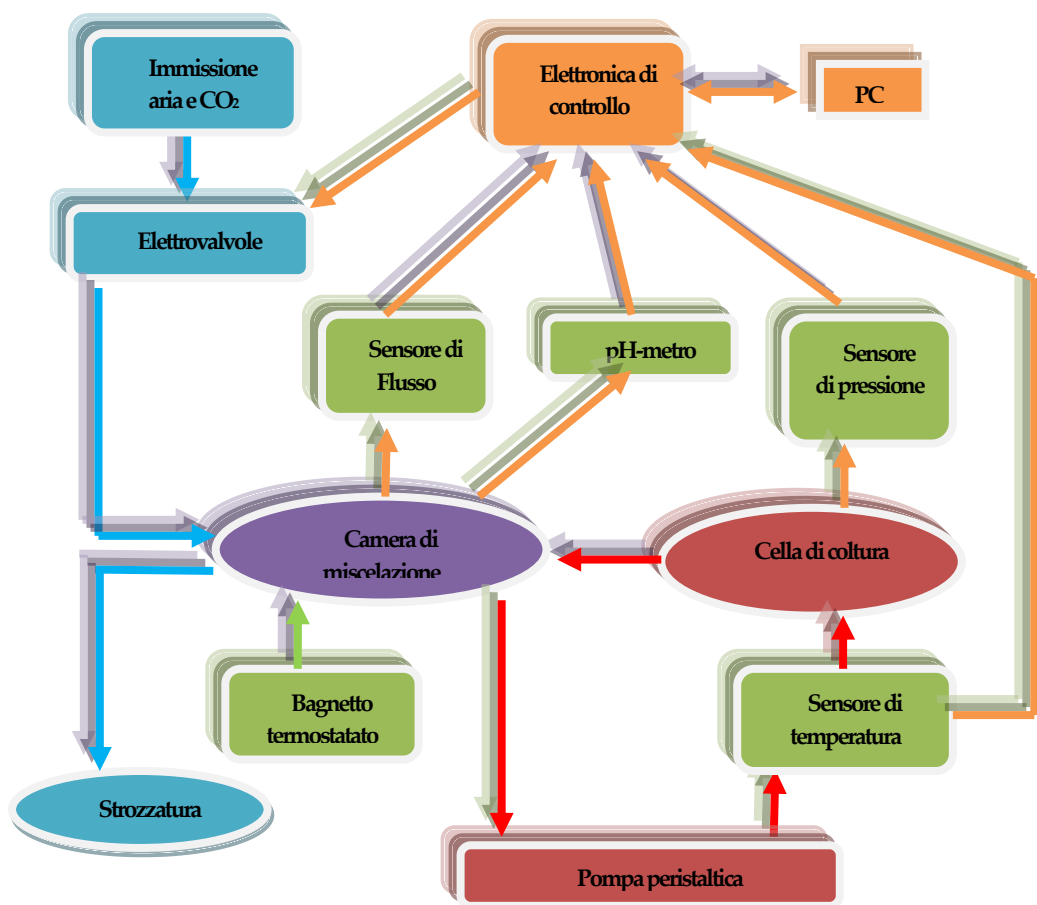


Figura 3-6: Schema controllo bioreattore.

Le tarature dei sensori vengono effettuate manualmente, mediante una lettura diretta, grazie all'apposito tool della National Instruments. Una volta calcolati i valori delle rette di taratura, questi vengono inseriti in appositi file di testo con estensione *.ini*, che il software provvederà a leggere all'avvio.

È disponibile, inoltre, una sezione di controllo manuale del sistema e un'altra di esportazione e visualizzazione dei dati. (2)

Il software in questione si è dimostrato essere abbastanza funzionale dal punto di vista del controllo, ma, durante il suo utilizzo presso il CNR di Pisa, ha mostrato numerosi problemi che ora andremo ad analizzare.

Uno dei problemi più importanti è legato alla strategia di controllo del pH, in quanto, come accennato precedentemente, questa si basa su una serie di dati acquisiti mediante test sperimentali, ed inseriti, sottoforma di tabella, nell'algoritmo di controllo.

Questo limita l'utilizzo del software a condizioni di lavoro "standard". Collegando, infatti, il bioreattore a nuove camere di miscelazione, o non controllando correttamente il rubinetto di strozzatura, ci si rende conto che il software non riesce a portare il sistema nel punto di lavoro desiderato, senza però segnalare alcun allarme di malfunzionamento. Questo comporta che, nella fase di avvio, l'operatore debba osservare attentamente l'andamento dei parametri, così da poter regolare la strozzatura secondo un approccio basato sull'esperienza acquisita nell'utilizzo del sistema.

Se, ad esempio, la strozzatura di uscita dei gas rimane troppo aperta, è impossibile far salire la pressione all'interno della camera di

miscelazione; l'operatore, pertanto, se ne può rendere conto verificando che, all'aumentare della tensione di controllo sul regolatore, la pressione in cella non sale. In questo caso il software continua ad aprire il regolatore di pressione per cercare di aumentare la pressione in cella, non curandosi, però, di osservare se il cambiamento di apertura del regolatore, comporti o no un effettivo innalzamento della pressione nella camera di miscelazione. Questo fa sì che, all'interno della camera, cominci a gorgogliare molta aria, che tende, per la presenza di tensioattivi, a produrre schiuma nel terreno e a far fuoriuscire quest'ultimo dal canale di sfiato.

Un altro problema che spesso si verifica è dovuto al fatto che, al di sopra dei 9 Volt di tensione di comando, fornita al regolatore di pressione, questo va in blocco, spegnendosi; il software però non fornisce alcun messaggio di errore e non integra alcun sistema di controllo atto all'evitamento del blocco.

Un altro inconveniente del software, che ne comporterà la completa riscrittura, risiede proprio nel linguaggio con cui è stato scritto. Il Visual Basic, infatti, è un linguaggio che non permette una comunicazione diretta con l'Hardware, e pertanto il software in questione si avvale di componenti ActiveX nella versione con National PCI, mentre si appoggia completamente sul runtime dei driver National Instruments nella versione USB.

E' bene sottolineare come i problemi riscontrati dal software non siano frutto di incompetenza o superficialità del programmatore che lo ha scritto, ma, piuttosto, nascono dal fatto che, quando il bioreattore è stato realizzato, si necessitava di un software che fosse semplicemente capace di leggere i dati dai sensori e controllare il sistema, secondo l'algoritmo

studiato. Tutto ciò per poter verificare il corretto funzionamento dell'architettura realizzata.

Ad oggi invece, il bioreattore in questione, sta diventando un vero e proprio macchinario da laboratorio e, pertanto, necessita di un nuovo software, che possa essere utilizzato da persone aventi conoscenze elettronico informatiche di base, come, ad esempio, ricercatori dell'area medico biologica.

Il nuovo software dovrà, quindi, essere user friendly, stabile, sicuro ed avere un sistema di controllo dell'errore e di analisi del rischio.

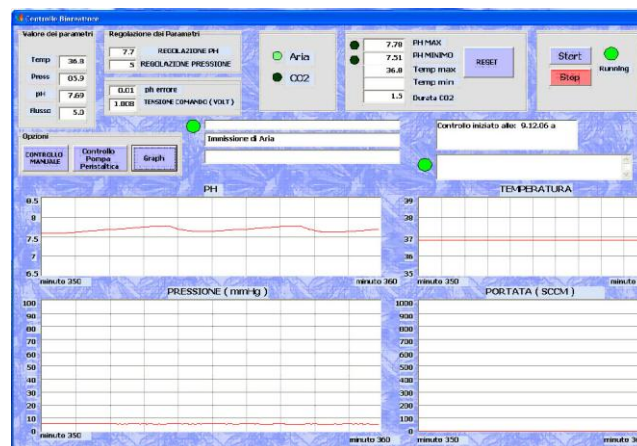


Figura 3-7: Il software attualmente presente sul sistema.

Bibliografia

1. **Federico, Vozi.** . *Tesi di laurea*. Pisa : Università di Pisa, 2000
2. **Rossi, Valerio.** . *Tesi di laurea*. Pisa : Università di Pisa, 2002

Capitolo 4

Obbiettivo della tesi

L'obbiettivo di questo lavoro di tesi, è la trasformazione ed ottimizzazione del bioreattore realizzato presso il Centro Interdipartimentale di Ricerca E.Piaggio, al fine di realizzare un macchinario autonomo, capace di riprodurre le condizioni fisiologiche e patologiche dei diversi tessuti cellulari, così da poter sottoporre quest'ultimi a varie analisi metaboliche e funzionali.

Il Bioreattore del Centro E.Piaggio è un prototipo che nasce dalle esperienze e gli studi fatti in questi anni di ricerca nel campo del tissue engineering. Questo prototipo, perfettamente funzionante, è attivo dal 2000 ed in questi sei anni è stato testato presso l'istituto di fisiologia clinica del CNR. Numerosi sono stati gli esperimenti effettuati che hanno visto spesso collaborazioni con altri enti, come il CTF di Pisa e l'istituto di neurofisiologia del CNR di Pisa.

Questa cospicua serie di esperienze ha portato alla luce alcune problematiche che non sarebbero mai potute venire alla luce durante le fasi di progettazione, ma che, come in ogni procedimento di realizzazione di un prodotto, si sono presentati durante il primo utilizzo pratico del sistema.

Come accennato nei precedenti capitoli, durante questi anni il tissue engineering ha assistito ad una vera e propria rivoluzione, in quanto vi è stato un cambiamento di rotta. Dalla realizzazione di tessuti in vitro, atti alla sostituzione funzionale di parti danneggiate, si è passati, infatti, allo studio delle interazioni che alcune molecole, farmaci o procedure,

hanno con i tessuti biologici coltivati in vitro, così da poter estrapolare dati utili alla comprensione dei fenomeni fisiologici presenti all'interno del nostro organismo.

La legge europea in materia di sperimentazione animale, che limita gli esperimenti su cavie alle sole ricerche finalizzate alla cura del cancro o allo studio di farmaci *salvavita*, a breve, costringerà le aziende farmaceutiche a trovare mezzi di sperimentazione alternativi. Il bioreattore del Centro E.Piaggio si inserisce perfettamente in questo contesto ed è pertanto necessario poter trasformare il sistema da prototipo, a macchinario commercializzabile, che possa essere utilizzato da personale del settore medico-biologico e non solo tecnico informatico.

Un altro aspetto fondamentale del nuovo macchinario, è quello relativo all'inserimento, nel prodotto finito, della nuova metodologia di analisi di tipo High Throughput. Questa nuova metodologia di esame, come precedentemente accennato, dà la possibilità di condurre esperimenti altamente performanti, in tempi molto brevi.

Con l'implementazione della strategia High Througput, il nuovo bioreattore si trasforma, da singolo sistema di testing su tessuti cellulari, ad un vero e proprio laboratorio di ricerca, capace di simulare numerose cavie. Sarà possibile testare come i diversi dosaggi o le diverse procedure, comportino su differenti soggetti, differenti risultati.

L'intero apparato verrà collegato ad un unico computer, che servirà da visualizzatore. Il controllo dell'omeostasi di ciascuna cavia sarà, però, svolto autonomamente da ciascun bioreattore.

Ciascuna cavia provvede al mantenimento della propria omeostasi fisiologica e l'utente può decidere di modificare le variabili di controllo, in modo da indurre in una di queste una patologia.

In queste ultime frasi si riassume il grande cambiamento che è stato apportato al bioreattore durante questo lavoro di tesi: il controllo che prima era deputato al software presente sul PC, adesso passa al bioreattore stesso, che diventa un'entità autonoma ed indipendente. L'interfaccia presente sul PC diventerà, quindi, un semplice strumento di configurazione e visualizzazione del sistema.

Prima di esaminare i cambiamenti apportati alla strategia di controllo del bioreattore, analizzeremo le modifiche che sono effettuate sulle varie parti che compongono il sistema.

Tutte queste modifiche sono frutto dell'esperienza di questi anni di test e nascono dall'esigenza di convertire il sistema da prototipo in fase di test, a prodotto finito, commercializzabile e capace di implementare la strategia High Throughput.

4.1 La nuova camera di miscelazione

Come accennato nel capitolo precedente, la camera di miscelazione rappresenta il luogo dove avviene l'interazione ed il mescolamento fra gas e terreno di coltura, e che permette il mantenimento del pH e la regolazione della pressione nella camera di trattamento.

Si è osservato come il problema più grave della precedente camera di miscelazione, fosse sicuramente il volume di terreno di coltura necessario per il riempimento. Questo eccessivo volume (circa 20 ml) comporta, infatti, una notevole diluizione dei metaboliti secreti dalle cellule durante la fase di coltura. Una tale diluizione può rendere molto

difficoltosa, se non impossibile, la successiva fase di analisi dei metaboliti, mediante gli appositi kit.

È stata quindi realizzata una nuova camera miscelazione, le cui dimensioni sono state notevolmente ridotte, così da non necessitare di un riempimento di materiale solido³.

Per il calcolo delle corrette dimensioni, è stato realizzato un modello 3D della camera di miscelazione, così da poter simulare il miscelamento dei gas con il terreno di coltura e calcolare quindi la quantità minima di terreno necessaria per il corretto funzionamento del sistema.

Grazie a questo modello, sono state ricavate le dimensioni minime per la realizzazione della nuova camera di miscelazione, che si è deciso di realizzare in vetro, al fine di rendere più agibili le fasi di sterilizzazione.



Figura 4-1: Modello 3D della nuova camera di miscelazione.

Si è cercato, quindi, un contenitore in vetro avente dimensioni simili a quelle ricavate dal modello, che risultavano essere circa 10 ml, optando, infine, per l'utilizzo di una bottiglia di circa 12 ml di volume interno,

³ PDMS nel caso della precedente camera di miscelazione.

facilmente reperibile in commercio perché utilizzata da numerose case farmaceutiche, per il confezionamento di farmaci in fase liquida.

Le bottiglie vengono vendute con un tappo in materiale plastico anch'esso sterilizzabile. Nel tappo è stato praticato, mediante una fustella, un foro passante di 6 mm di diametro, necessario per il passaggio dei vari tubi di collegamento.



Figura 4-2: Bottiglie utilizzate per la realizzazione.

E' stato necessario, però, risolvere il problema del pH-metro che, avendo dimensioni decisamente grandi⁴, non poteva essere alloggiato all'interno della camera di miscelazione, come veniva fatto in precedenza.

Si è provveduto, quindi, all'acquisto di un nuovo pH-metro ad ago, avente una sonda lunga circa 60 mm con un diametro di 3 mm (1). Questo nuovo pH-metro viene inserito nella camera di miscelazione mediante un tubo in silicone, che permette l'inserimento dell'ago sonda

⁴ Diametro 12 mm e lunghezza 130 mm.

e, allo stesso tempo, essendo di dimensioni pari a quelle della sonda, fornisce la necessaria tenuta pneumatica alla camera di miscelazione.

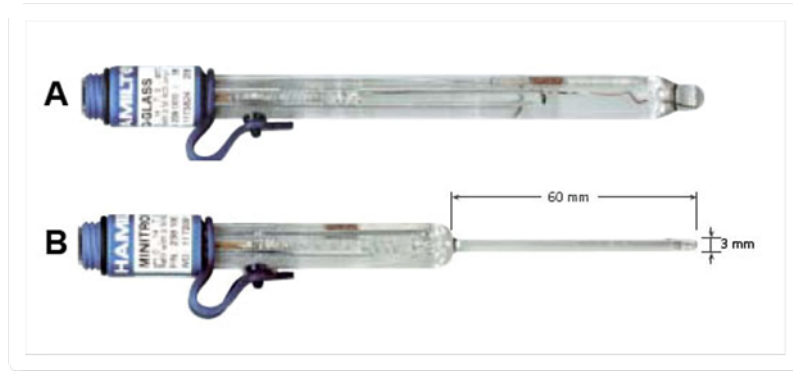


Figura 4-3: Vecchio (A) e nuovo (B) pH metro.

Le cannule di vetro alla quale venivano connessi i vari tubi di collegamento, sono state sostituite da tubi in silicone con un diametro interno di 1 mm. L'immissione dei gas avviene invece attraverso un ago cannula di 3 mm di diametro, la cui cannula esterna è fissata al tappo insieme a tutti i tubi in silicone, mediante un molding di PDMS.

In questo modo è possibile estrarre l'ago che, essendo metallico, potrebbe dare problemi durante la fase di sterilizzazione al gas plasma con H_2O_2 . È possibile, inoltre, sostituire l'ago nel caso in cui questo si ostruisca o si danneggi, in conseguenza alle numerose aperture e chiusure della camera di miscelazione.

La struttura così realizzata ha una perfetta tenuta pneumatica, verificata immergendo la camera di miscelazione in acqua e applicando pressione, al fine di rilevare eventuali perdite. La camera così realizzata è, quindi, facilmente sterilizzabile e altamente biocompatibile.



Figura 4-4: La nuova camera di miscelazione durante i test con terreno di coltura.

La nuova camera di miscelazione necessita, per il riempimento, di soli 7 ml di terreno rispetto ai 20 ml della precedente; questo risolve i problemi legati all'eccessiva diluizione del terreno che si avevano con la precedente camera di miscelazione, in quanto il volume totale di terreno richiesto per il funzionamento del sistema, passa da circa 30 ml a circa 17 ml, con conseguente riduzione del volume di circa 43%, e pertanto un aumento nelle concentrazioni dei metaboliti secreti dalle cellule durante la coltura.

E' stato affrontato, inoltre, il problema relativo alla formazione della schiuma, che tendeva a far fuoriuscire il terreno dalla camera, con conseguente calo del livello. Nel terreno di coltura, infatti, sono presenti dei tensioattivi, utilizzati per aumentare la bagnabilità, la spandibilità, e quindi la miscibilità; aiutano, quindi, a stabilizzare sospensioni ed emulsioni quali il terreno di coltura, e permettono, pertanto, la "miscelazione" di composti lipofili e idrofili che altrimenti si separerebbero in fasi. (2)

Questi tensioattivi tendono, però, a formare schiuma quando viene fatto gorgogliare all'interno del terreno del gas.

Si è provveduto, quindi, alla realizzazione di una piccola camera di recupero schiuma. Questa camera è realizzata mediante una provetta Falcon, dove sono stati praticati tre fori: due sul tappo ed uno sul fondo. In questi fori sono stati inseriti tre tubi in silicone, bloccati mediante un molding di PDMS. I due tubi inseriti nel tappo hanno un diametro interno di 2 mm, mentre il tubo sul fondo ha un diametro di 1 mm.

Il tubo di sfiato gas della camera di miscelazione, da dove tende a fuoriuscire la schiuma, è stato collegato in ingresso ad uno dei tubi entranti dal tappo della Falcon; l'altro tubo inserito nel tappo è stato collegato alla strozzatura e permette la regolazione della pressione in cella. Il tubo collegato al fondo della provetta passa, invece, per la pompa peristaltica e poi rientra nella camera di miscelazione.

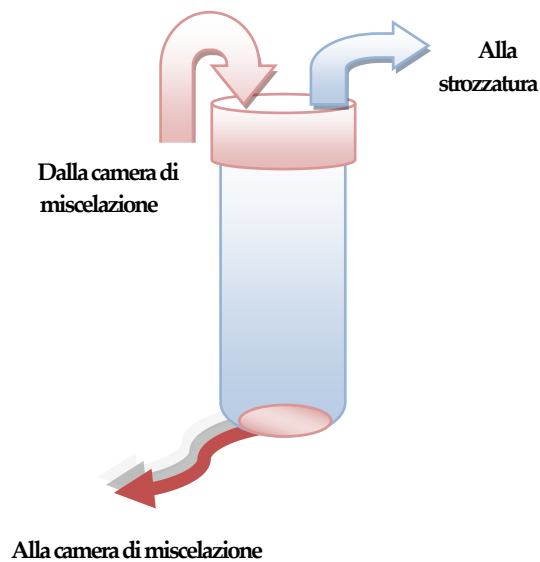


Figura 4-5: Collegamento e funzionamento della camera di recupero schiuma.

In questo modo la schiuma arriva nella Falcon, dove si trasforma in liquido che può essere ripompato nella camera di trattamento,

mediante il tubo posto sul fondo, risolvendo così, il problema del calo di livello dovuto alla perdita di terreno per schiumatura.

La nuova camera di miscelazione è stata testata collegandola al bioreattore, così da valutare l'effettiva tenuta pneumatica in condizioni di lavoro standard, ma, soprattutto, per testare l'efficienza del sistema di immissione gas, responsabile della regolazione del pH.



Figura 4-6: Camera di recupero schiuma collegata.

Dai test condotti, si è rilevato come la diffusione del gas nel terreno di coltura avvenga correttamente, permettendo, un perfetto controllo del pH ed una corretta ossigenazione del terreno.

E' stata, valutata, inoltre la quantità di schiuma prodotta e l'effettiva capacità del sistema di recupero di reinserire in circolo il terreno perso.

4.2 Il nuovo sistema di riscaldamento

Realizzata la nuova camera di miscelazione, è stato necessario pensare ad un nuovo sistema di riscaldamento, capace di mantenere a temperatura controllata le camere di miscelazione ed il terreno in esse contenuto. Questo nuovo sistema di riscaldamento è stato progettato

per facilitare l'utilizzo in modalità High Throughput del bioreattore. Infatti, in un bioreattore, la temperatura è l'unico parametro che viene monitorato, ma raramente controllato o modificato e, generalmente, all'interno del sistema, si imposta una temperatura tale da mantenere la coltura cellulare a 37 °C.

Si è pensato, quindi, di realizzare un sistema di riscaldamento multiplo, capace di riscaldare contemporaneamente quattro camere di miscelazione. In questo modo, è possibile utilizzare un unico riscaldatore per tutte e quattro le camere di miscelazione, risparmiando notevolmente sia in costi di installazione, che in spazi di lavoro.

Vista la possibilità di controllare la temperatura in modo univoco per tutti e quattro i bioreattori, anche il sistema di controllo è stato centralizzato. È così possibile, con un unico sensore, monitorare la temperatura del liquido di riscaldamento delle 4 camere di miscelazione.

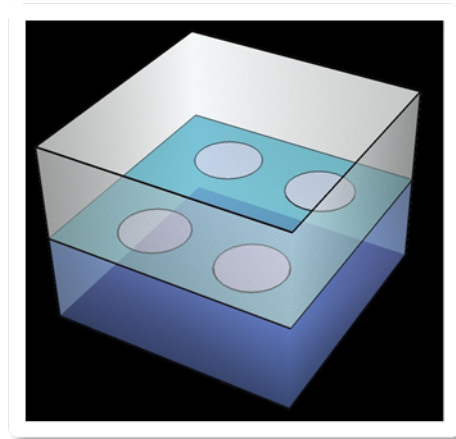


Figura 4-7: Modello 3D del nuovo sistema di riscaldamento.

Durante questo lavoro di tesi, non si è provveduto alla realizzazione di un sistema di riscaldamento controllato direttamente dal bioreattore, ma ci si è limitati ad utilizzare un bagnetto termostatico per il

riscaldamento del liquido e, un sensore di temperatura, posto su una delle colture cellulari, ha dato la possibilità di leggere i valori di temperatura della coltura.

Per garantire che anche le altre colture cellulari fossero alla stessa temperatura, ci si è assicurati che i tubi di collegamento di queste fossero tutti della stessa lunghezza, così da eguagliare la dispersione termica presente lungo il percorso. Si è provveduto, infine, ad inserire tutte le camere di coltura in un medesimo contenitore isolante, così da limitare la dispersione di calore e il conseguente raffreddamento delle colture.

Le cellule sono infatti molto sensibili agli sbalzi di temperatura e potrebbero facilmente alterare i loro processi fisiologici qualora il terreno, nel tragitto dalla camera di miscelazione alla cella di trattamento, si raffreddasse eccessivamente.

Risulta, però, altrettanto importante, il controllo della temperatura nella camera di miscelazione, in quanto, per far sì che le cellule si trovino alla temperatura di 37 °C, si tende a riscaldare di qualche grado in più la zona di miscelazione, così che il raffreddamento del terreno nel tragitto non comporti un'eccessiva discesa della temperatura.

Alcune proteine però, a temperature prossime ai 40 °C, tendono a denaturarsi, con conseguente compromissione dell'esperimento.

Il sistema deve essere quindi in grado di controllare la temperatura della zona di miscelazione, per permettere alle cellule di trovarsi ad una temperatura di 37 °C, ma nel frattempo deve monitorare la zona di trattamento, al fine di evitare la denaturazione delle proteine.

Questo controllo è stato effettuato controllando la temperatura del bagnetto, in modo tale da avere, nelle camere di coltura, una temperatura di 37 °C. In questo modo si è potuto verificare che il bagnetto non superasse i 40 °C di temperatura ed infatti, con una lunghezza dei tubi di circa 1 m, si è potuto impostare il bagnetto ad una temperatura di 39°C.

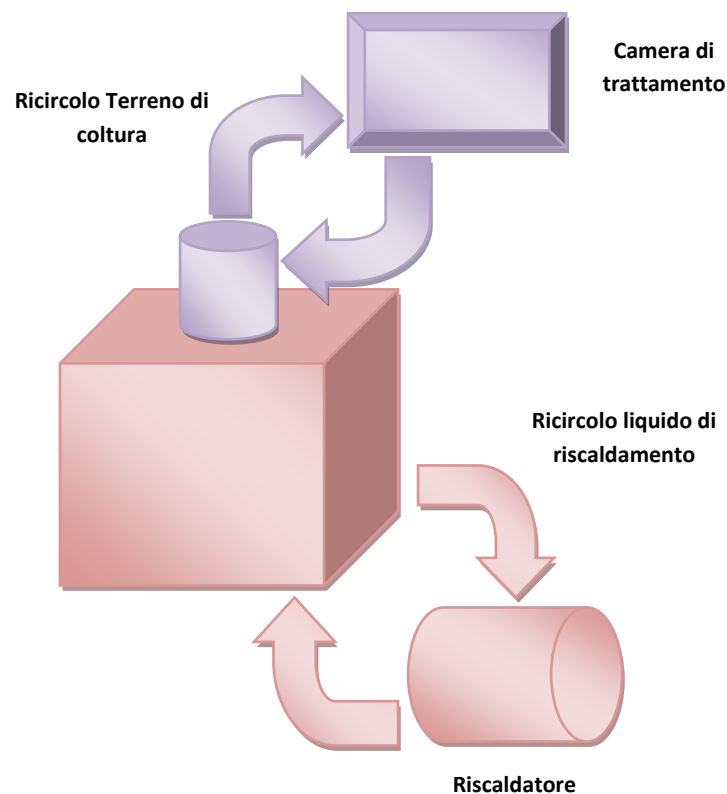


Figura 4-8: Schema di funzionamento del riscaldatore.

Il sistema di riscaldamento progettato è stato dimensionato per ospitare perfettamente la nuova camera di miscelazione ed è interamente realizzato in Plexiglas trasparente, al fine di poter rilevare eventuali versamenti di terreno che, colorando l'acqua utilizzata per il riscaldamento, attirerebbero l'attenzione degli operatori.

Il Plexiglas permette inoltre una facile pulizia ed è resistente alla maggior parte dei prodotti chimici utilizzati in un laboratorio di ingegneria tissutale.

L'apparato è costituito da una scatola avente al suo interno, circa a metà altezza, una superficie dove sono stati praticati quattro fori per l'inserimento delle camere di miscelazione; in questo sistema viene fatta circolare acqua calda, mediante due connettori posti su due pareti opposte e collegati al bagnetto termostato.

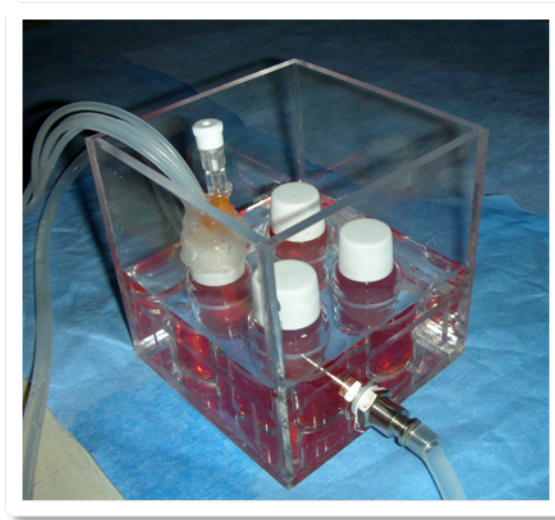


Figura 4-9: Apparato di riscaldamento con le quattro camere di miscelazione.

L'apparato prevede, inoltre, un coperchio anch'esso in Plexiglas trasparente, che aiuta a mantenere la temperatura delle camere di miscelazione costante.

Prima di passare all'analisi della parte elettronica, riepiloghiamo, in un grafico, le varie connessioni del nuovo sistema di miscelazione e circolazione del bioreattore (figura 4.10), così per meglio comprendere l'architettura del nuovo sistema.

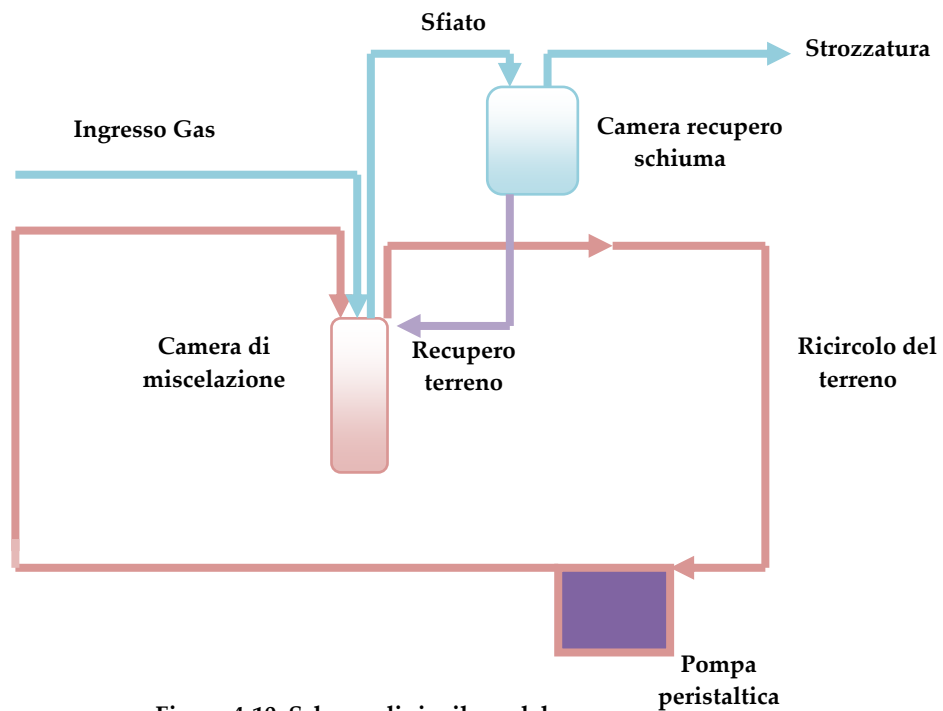


Figura 4-10: Schema di riempimento del nuovo bioreattore.

4.3 Elettronica di controllo

L'elettronica di controllo del nuovo bioreattore è stata completamente rivoluzionata, al fine di trasformare il prototipo da laboratorio, in un nuovo prodotto ottimizzato e finalizzato all'utilizzo anche da parte di utenti con scarse conoscenze elettronico informatiche.

Si è provveduto all'eliminazione della scheda National Instruments, sostituita da una scheda Wildfire, basata sul micro controllore della Motorola, chiamato *Coldfire*.

A differenza della vecchia scheda, la Wildfire non è una semplice scheda di acquisizione dati, ma un vero e proprio calcolatore. Le sue caratteristiche fondamentali sono:

- Processore a 32 bit con clock a 64 Mhz.
- 16 Mb di memoria Ram.

- 4Mb di memoria Flash dove poter caricare il Software di controllo (Firmware).
- 3 porte seriali.
- 8 convertitori A/D.
- 24 Input/Output digitali dedicati.
- 1 porta Ethernet.
- 1 slot per l'inserimento di schede di memoria SD con capacità fino a 1 Gbyte.(1)

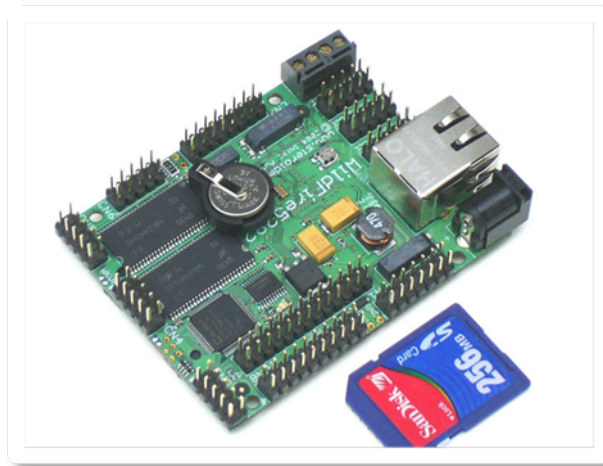


Figura 4-11: Scheda di controllo Wildfire 5282.

Con l'utilizzo di questa scheda, il bioreattore diventa, quindi, un sistema autonomo, avente al suo interno il proprio sistema di controllo e pianificazione, e dipendente dall'esterno solo per quanto riguarda l'impostazione dei parametri di lavoro e la visualizzazione.

Oltre ad aver trasformato completamente il sistema di controllo del bioreattore, grazie alla scheda Wildfire, è stato possibile ridurre notevolmente i costi di realizzazione dell'intero sistema. Eliminando la scheda National Instruments, si risparmiano circa 1200 €, senza considerare che, adesso, il sistema è collegabile a qualsiasi PC avente

una porta Ethernet e, soprattutto, che questo PC non dovrà essere dedicato al solo collegamento con il bioreattore.

Il prototipo di bioreattore del Centro E.Piaggio funzionava in precedenza come una periferica del PC; il computer infatti, monitorava mediante i convertitori Analogico/Digitale della scheda National Instruments, i valori provenienti dai vari sensori, e controllava il sistema regolando la pressione e decidendo il tipo di gas da immettere, basandosi sull'algoritmo di controllo inserito nel software.

Adesso, invece, il controllo del sistema è effettuato dal bioreattore stesso; l'utente si trova di fronte ad un box contenente le elettrovalvole, l'alimentazione e "l'intelligenza" del bioreattore.

Grazie, infatti, alle ridotte dimensioni della scheda Wildfire, è possibile ospitare il tutto all'interno del case contenente le elettrovalvole e gli stadi di alimentazione del sistema.

La nuova scheda Wildfire è equipaggiata, inoltre, con uno slot SD, capace di leggere e scrivere su schede fino ad 1 Gbyte di capacità; il sistema può così archiviare i dati dell'esperimento per tempi molto lunghi⁵, senza che sia necessaria la connessione ad un PC. I dati registrati vengono poi trasferiti sul software interfaccia al momento della connessione e, mediante questo apposito software, è possibile sia visualizzare che eventualmente esportare il tutto.

E' importante notare come questo cambiamento sia una vera e propria svolta nella strategia di controllo del bioreattore e, soprattutto, trasforma definitivamente il bioreattore da apparato di sperimentazione, a vero e proprio macchinario autonomo per la coltivazione di tessuti cellulari.

⁵ Leggendo dai 4 sensori con una frequenza di una volta al secondo si possono immagazzinare sulla scheda SD esperimenti di durata superiore a 100 giorni.

Grazie a questo cambiamento, è possibile, infatti, collegare il sistema alla rete Ethernet del laboratorio, mediante l'apposita connessione presente sulla scheda Wildfire, dopodiché, una volta acceso il bioreattore, tramite il software di interfaccia, ci si può collegare all'apparato ed effettuare tutte le procedure di avvio, taratura, lettura dati ecc.

Una volta avviato l'esperimento è possibile scollegare il PC dal sistema, senza che questo comporti un'interruzione del controllo, come avveniva precedentemente con l'utilizzo della scheda National Instruments.

Ipotizziamo, per esempio, di voler iniziare un nuovo esperimento; dopo aver montato l'hardware del bioreattore ed acceso il sistema, basterà collegarsi, mediante la rete, alla scheda di controllo⁶ ed avviare le procedure di taratura. Dopo aver effettuato la taratura del sistema, sarà possibile impostare i parametri di lavoro, quali pH e pressione ed infine verrà avviato l'esperimento.

Da questo momento, il controllo del sistema è deputato al bioreattore stesso che, mediante l'apposito software di controllo, provvederà al mantenimento in cella della pressione e del pH richiesti.

In caso di problemi, il sistema invierà all'interfaccia un messaggio di errore ed, in caso di mancato intervento da parte dell'utente, potrà decidere, dopo un'attesa impostata in fase di programmazione, di arrestare il sistema al fine di prevenire eventuali danneggiamenti⁷.

⁶ Verrà assegnato un IP fisso alla scheda Wildfire.

⁷ Le specifiche del software e dell'algoritmo di controllo verranno affrontate più dettagliatamente nei successivi capitoli.

Il passaggio dalla scheda National alla nuova scheda di controllo, ha necessitato di un particolare lavoro di adattamento elettronico del sistema di controllo del bioreattore.

Come accennato in precedenza, dal case di controllo elettrovalvole e lettura sensori, escono segnali con una dinamica nel range ± 12 Volt, mentre la scheda Wildfire legge tensioni in ingresso comprese nell'intervallo 0 – 5 Volt.

Un altro problema presentatosi durante la sostituzione della scheda National Instruments, è l'assenza, a bordo della Wildfire, di un convertitore D/A, capace di generare una tensione compresa fra 0 e 5 Volt, necessaria al controllo del regolatore di pressione. Infine si è dovuto innalzare le tensioni in uscita dai Pin Digital I/O della Wildfire mediante dei Pull-UP, per poterli utilizzare come pin di controllo delle elettrovalvole.

Essendo, infatti, la Wildfire costruita con un'architettura hardware di tipo TTL, presenta sui Pin digitali, tensioni di livello alto pari a 3,3 Volt, mentre le elettrovalvole di apertura dei gas sono controllate da un sistema basato su hardware CMOS e quindi necessitano di 5 Volt come tensione di livello alto per attivarsi.⁸

Come precedentemente accennato, l'intero sistema è adesso contenuto nel case contenente le elettrovalvole; questo comporta una notevole riduzione degli spazi necessari all'installazione del bioreattore, in quanto si elimina la presenza di un PC desktop con il relativo monitor. Inoltre sono stati eliminati i lunghi cavi di collegamento che portavano i segnali dal box elettrovalvole alla scheda National Instruments,

⁸ *Queste modifiche elettroniche, vista la loro complessità, saranno affrontate, in seguito, in un capitolo dedicato.*

riducendo quindi il rumore elettronico, con un conseguente aumento della qualità del segnale analizzato.

Utilizzando il collegamento Ethernet, non si è più vincolati ad avere il PC collegato al bioreattore nelle vicinanze del sistema, ma è possibile controllare il sistema da un qualsiasi PC facente parte della rete del laboratorio o, se è disponibile un indirizzo IP pubblico da assegnare al sistema bioreattore, è possibile controllare da casa l'intero esperimento.

È già in fase di studio un sistema di segnalazione errori basato sull'invio di mail o SMS, così da poter informare di eventuali malfunzionamenti gli operatori, anche se questi non fossero direttamente collegati al sistema.

E' stato deciso di mantenere la parte elettronica di controllo delle elettrovalvole e lettura sensori, in quanto queste si sono dimostrate essere funzionali e ben fatte. Si è preferito, quindi, realizzare una nuova elettronica di interfacciamento, così da permettere sia il collegamento con la nuova Wildfire, che l'eventuale collegamento del sistema al vecchio apparato di controllo.

Bibliografia

1. *Wildfire 5282 Reference* **Intec Automation Inc.** 2004

Capitolo 5

Il software

L'utilizzo del bioreattore del Centro E.Piaggio presso l'istituto di fisiologia Clinica del CNR di Pisa, ha portato all'individuazione di alcuni problemi relativi al software di controllo, analizzati dettagliatamente nei capitoli precedenti.

Basandosi su un'attenta analisi dei suddetti problemi, si è provveduto, quindi, alla progettazione del nuovo software di controllo del sistema bioreattore.

L'analisi effettuata ci ha portato a dover riscrivere completamente il nuovo software; un adeguamento del precedente sarebbe stato, infatti, impossibile per numerosi motivi: primo fra tutti il cambiamento di architettura del nuovo sistema rispetto al prototipo iniziale.

È bene ricordare, a tal proposito, come, nel nuovo bioreattore, non esista più un PC con controllo diretto dell'hardware mediante una scheda National Instrument; al suo posto è stata inserita una scheda con un micro-controllore (Motorola ColdFire) nel quale viene scaricato il software di controllo vero e proprio. Un software grafico consente di monitorare ed interagire col software in esecuzione. I dati ricevuti dal micro-controllore possono essere salvati e sono presentati sotto forma di grafici, che mostrano lo stato così come viene misurato dai sensori a bordo del bioreattore.

Poiché il nuovo sistema prevede l'utilizzo di due software separati e distinti, con due diverse architetture e scritti in due linguaggi differenti,

non è stato possibile riutilizzare il codice della precedente applicazione, a causa della sua struttura monolitica.

Il primo prototipo di software del sistema bioreattore è stato scritto in Visual Basic 6, un linguaggio ormai obsoleto e dalle potenzialità limitate; inoltre, la scheda di controllo Wildfire, è programmabile in C o C++, richiedendo comunque una riscrittura del codice Visual Basic in C.

Il software del vecchio bioreattore aveva, inoltre, una gestione degli eventi basata su 3 timer: uno per la grafica delle finestre, uno per la lettura dei sensori e uno per l'attuazione delle elettrovalvole e del regolatore di pressione. Questa strategia non è sicuramente una soluzione ottimale, e non sarebbe comunque implementabile nel nuovo software, in quanto, la parte di visualizzazione e controllo del sistema, risultano separate in due software distinti.

La Wildfire, come molti microcontrollori, non ha un sistema operativo a bordo, ma un semplice BIOS con un loader di programmi. Per questo motivo è stato implementato un timer condiviso, basato su uno Heap, struttura che consente di inserire, in una coda di esecuzione, vari task, che saranno estratti dallo heap a seconda del momento in cui andranno eseguiti.

Questo approccio permette l'esecuzione di numerosi task, mantenendo il controllo sul loro tempo di esecuzione e sulla frequenza delle ricorrenze.

È stato necessario scrivere un vero e proprio sistema operativo per la scheda Wildfire, che comprende: il sistema di esecuzione multi-tasking cooperativo (basato sullo Heap), un'interfaccia di comunicazione che sfrutti il canale Ethernet ed un sistema di controllo dell'hardware e di lettura dei sensori.

Questo sistema operativo per scheda Wildfire è stato scritto durante questo lavoro di tesi con il supporto di Antonio Cisternino, ed è stato chiamato $\mu TnetOS$, acronimo di: Sistema Operativo per Microcontrollori con supporto di Rete (Net) e Timer per accodamento task.

$\mu TnetOS$ è stato scritto per essere compatibile con un libreria sviluppata dal Dipartimento di Informatica dell'Università di Pisa ed in parte inserita in un framework recentemente rilasciato da Microsoft Corporation: *Microsoft Robotics Studio*⁽¹⁾.

Questa libreria, chiamata *Robotics4.Net*, è un sistema per lo sviluppo di software per il controllo di robot, con architettura bio-inspirata.

5.1 Robotics4.Net

Robotics4.Net è un Framework di programmazione atto allo sviluppo di controlli per robot che permette di sviluppare software aventi architetture di tipo bio-simile. I modelli di astrazione su cui si basa sono, infatti, ispirati al sistema nervoso umano, in linea con il nuovo filone di ricerca sull'Intelligenza Artificiale Embodied e bio-simile.

Un sistema di controllo basato su Robotics4.Net si compone di 3 elementi base:

Il Brain: un modulo software responsabile della parte cognitiva del sistema di controllo.

La Bodymap: una sorta di lavagna utilizzata dal sistema per permettere la comunicazione tra il Brain e il resto del sistema.

Un insieme di Roblet: un Roblet è un software indipendente che comunica con il Brain attraverso la Bodymap.

Il Brain ed i Roblets lavorano in parallelo e comunicano fra di loro attraverso messaggi XML⁹. I Roblet scrivono i messaggi nella Bodymap, questi vengono letti dal Brain, che può rispondere scrivendo un nuovo messaggio nella Bodymap.

In Robotics4.NET è inoltre possibile, in via eccezionale, realizzare una sorta di comunicazione diretta fra Roblet, che generalmente non possono parlare fra loro.

I Roblet rappresentano i vari elementi di un sistema vivente: come ad esempio una gamba, un occhio, un orecchio ecc. L'esecuzione di questi è temporizzata e, durante la fase di avvio ogni Roblet dichiara la propria frequenza di lavoro e la struttura della propria interfaccia di comunicazione¹⁰. Il software in esecuzione sul micro-controllore sarà visto dal resto dal sistema come un roblet e la frequenza servirà per l'accodamento nello heap.

Il Brain svolge, invece, le funzioni cognitive del controllo ed ha una struttura interna di tipo classico; si preoccupa di ospitare la Bodymap che, grazie ad un sistema di ricezione messaggi, avverte il Brain della presenza di messaggi in ingresso.

Un'altra particolarità di Robotics4.Net è quella di prevedere un protocollo di comunicazione asincrono, così che i messaggi possano tranquillamente essere inviati in modo casuale, oppure perdersi senza compromettere la stabilità del sistema. Grazie a questo sistema, i vari Roblet possono essere tranquillamente riavviati in caso di blocco, senza che il sistema vada riavviato interamente.

⁹ Analizzeremo il linguaggio XML nei prossimi paragrafi.

¹⁰ Il roblet invia alla bodymap un messaggio XML contenente tutti i campi che in futuro potrà inviare o ricevere, oltre ai propri dati identificativi.

Se un roblet si blocca, la Bodymap cesserà semplicemente di ricevere informazioni da esso (come se un arto smettesse di comunicare il suo stato al cervello). Una volta riavviato, il roblet, comincerà nuovamente ad inviare informazioni alla Bodymap senza nessun bisogno di un riavvio di quest'ultima. Lo stesso si può dire nel caso opposto: se la Bodymap smette di funzionare, i roblet continuano comunque nella comunicazione e il suo riavvio sarà indolore per il resto del sistema. La robustezza della comunicazione è legata all'impiego del protocollo UDP piuttosto che TCP.

Ogni roblet comunica continuamente con la Bodymap il proprio stato, così come accade nel corpo, generando un senso di presenza nella Bodymap del resto del corpo.

I messaggi sono costruiti come alberi XML e viaggiano sulla rete come pacchetti UDP; per questo motivo hanno un limite massimo di grandezza pari alla MTU della rete utilizzata; nel caso dello stack openTCP utilizzato dalla Wildfire, questo limite è fissato ad un Kbyte. Una volta inviato, da parte di un Roblet, un messaggio alla Bodymap, questa si preoccupa di inserirlo in un grande albero XML principale, che permette al Brain di avere sempre una visione d'insieme del sistema. Questo albero XML presente nella Bodymap, rappresenta l'interfaccia di comunicazione fra sistema nervoso centrale ed il sistema nervoso periferico ed è, di conseguenza assimilabile, al nostro cervelletto.

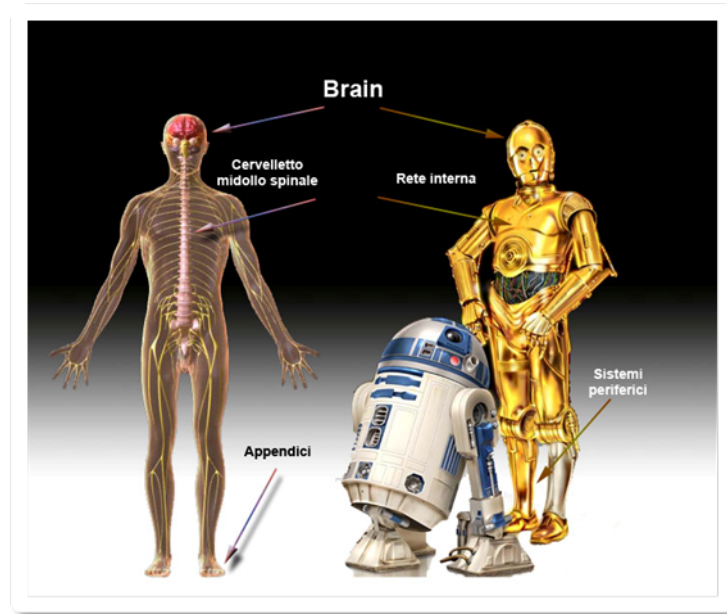


Figura 5-1: Confronto fra sistema nervoso biologico ed architettura Robotics4.NET .

A titolo di esempio, riportiamo una classe che implementa il battito cardiaco di ciascun Roblet, ovvero il messaggio di alive che in questo caso viene inviato dal Roblet ogni 30 secondi.

```
public class HeartBeatMessage : RobletMessage {
    public long beat;
    public HeartBeatMessage() {
        beat = DateTime.Now.Ticks;
    }
}
[OutputMessage(typeof(HeartBeatMessage))]
public class HeartBeat : RobletBase {
    public override void Initialize() {
        Frequency = 0.5;
    }
    public override void Run() {
        SendMessage(new HeartBeatMessage());
    }
}
```

Come nei sistemi viventi, in Robotics4.NET, esiste una sorta di intelligenza periferica capace, di effettuare una prima elaborazione dei segnali in ingresso al sistema, e di rielaborare le informazioni inviatele

dal Brain, prima di trasformarle in azioni. I Roblet comunicano mediante l'interfaccia di rete, che può essere vista come la rete di assoni di un sistema vivente, dove viaggiano i pacchetti contenenti le informazioni. Ogni volta che un Roblet legge nella Bodymap un messaggio destinato a lui lo copia e, se necessario, avvia la serie di procedure atte al compimento dell'azione richiesta dal Brain. (2)

Ad esempio, se il Brain di un robot decide di spostare il sistema in avanti di un metro, invierà ai motori, quindi ai due Roblet *MotorSx* e *MotorDx*, il messaggio "*avanti di un metro*"; questi, una volta letto il messaggio dalla Bodymap, inizieranno a calcolare quanti giri delle ruote sono necessari affinché il robot si sposti in avanti di un metro e avvieranno i motori in modo tale da effettuare lo spostamento richiesto.

Da questo esempio, è facile intuire una delle innovazioni fondamentali che Robotics4.Net ha introdotto nel mondo della robotica. Ipotizziamo per esempio, di voler spostare il nostro software di controllo da un robot ad un altro avente un'architettura hardware differente; saremmo costretti a riscrivere il software per riadattare il controllo al nuovo hardware. Con Robotics4.Net, invece, è necessario riscrivere solo ed esclusivamente i Roblet e potremmo trasferire il Brain da una piattaforma all'altra senza dover cambiare una sola riga di codice. Questo vuol dire che sarà possibile creare robot aventi al loro interno più programmi in esecuzione rappresentanti i Roblet dedicati; avviando il Brain, questo sarà in grado di comandare il robot, senza che nessuno gli abbia dovuto dire su che robot è installato. Saranno i Roblet stessi ad inviargli, mediante la Bodymap, le loro interfacce di comunicazione, dando così al Brain un'immagine, a lui comprensibile, del nuovo sistema. (3)

Questo lavoro ha portato allo sviluppo di un nuovo robot chiamato R2D2, che è diventato il tester per la nuova piattaforma robotica sviluppata.

A dimostrazione di quanto affermato sopra con Robotics4.Net, è stato possibile controllare, con lo stesso Brain, due robot aventi architetture completamente diverse, come L'ER1 della Evolution Robotics ed R2D2, il robot sviluppato dal team di Robotics4.Net¹¹.



Figura 5-2: ER1 e R2D2 a confronto.

Il Brain ha fatto compiere ai due Robot lo stesso task senza conoscere, in fase di compilazione, su chi dei due fosse montato. Grazie alla comunicazione con i vari Roblet residenti sui due diversi robot, il Brain ha potuto controllare l'hardware senza alcun problema.

Durante il test, i due robot sono stati fatti muovere nell'edificio del Dipartimento di Informatica dell'Università di Pisa, campionando i segnali wireless provenienti dai vari access point e ricostruendo così la mappa dei segnali wireless dell'edificio; tutto ciò evitando persone ed ostacoli, grazie all'utilizzo di vari sensori ad ultrasuoni e di una webcam.

¹¹ L'R2D2 Team è composto da Vincenzo Ambriola, Antonio Cisternino, Diego Colombo, Giorgio Ennas ed ha sede presso il dipartimento di Informatica dell'Università di Pisa

5.2 Lo Heap

Uno Heap è una struttura dati utilizzata in informatica, più precisamente un albero binario quasi completo, usato principalmente per la memorizzazione di collezioni di dati, dette dizionari.

In ogni nodo è presente una coppia (k,x) in cui k è il valore della chiave associata alla entry x . Nei dizionari, a differenza delle mappe, ogni chiave può essere associata a più entry (come in un "reale" dizionario, ad ogni parola, sono associati più significati).

Questi tipi di albero hanno la caratteristica che qualsiasi nodo padre ha chiave minore di entrambi (se esistono) i suoi figli. In questo modo si garantisce che, compiendo un qualsiasi percorso che parte da un nodo v dell'albero e scendendo nella struttura verso le foglie, si attraversino nodi con chiave sempre crescente.

Questa tipologia di alberi, nella programmazione, viene spesso implementata attraverso l'utilizzo di **vettori**, comprendenti un numero N di celle (con indici da 0 a $N-1$): la prima cella (indice 0) rappresenta la radice, mentre nella posizione $N-1$ viene memorizzato l'ultimo elemento; di conseguenza, il primo posto libero per un eventuale inserimento, sarà alla posizione N .

Dato quindi un nodo nella posizione i , gli eventuali figli saranno nelle celle $2i$ (sinistro) e $2i+1$ (destro).

Nella figura 5.3 è possibile osservare quanto sopra descritto; in aggiunta si può dire che viene definito come "ultimo" l'elemento che si trova più a destra nel livello delle foglie. (4)

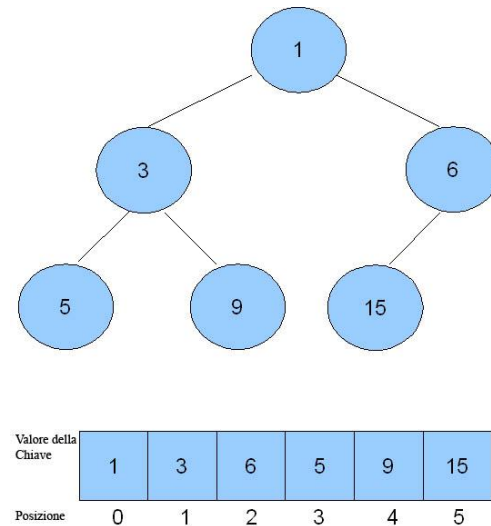


Figura 5-3: La struttura dello Heap.

Grazie a queste proprietà, la struttura Heap ci assicura che, nella radice, si trovi sempre l'elemento con chiave più piccola; pertanto sarà possibile, attraverso una procedura di estrazione, andare a prendere il task avente la scadenza più breve, e quindi vicina, preparandosi ad eseguirlo.

Lo Heap non è una struttura statica; all'avvio del programma è necessario prevedere una fase di riempimento. Questa fase prevede l'inserimento dei vari task passando, come chiave dello Heap, il valore in microsecondi della scadenza (o ricorrenza).

La procedura di inserimento viene fatta ricorsivamente per ogni elemento ed è seguita dalla funzione di percolazione dell'albero.

Questa funzione si preoccupa di mantenere la proprietà di ordinamento dello Heap; infatti scorre l'albero in salita a partire dal punto di inserimento dell'ultimo elemento e verifica che non esistano posizioni di livello superiore aventi chiave più bassa. Se esiste un "Padre" con una chiave più bassa di quella del "Figlio", questi vengono scambiati di posizione, il tutto ricorsivamente, fino a raggiungere la testa dell'albero, ovvero la radice.

In questo modo, ogni volta che nello Heap viene inserito un nuovo elemento, questo viene momentaneamente inserito nella posizione N (la prima libera); poi, mediante la funzione *"Percolate Down"*, viene spostato nella posizione dettata dalla grandezza della sua chiave.

Esiste una funzione di estrazione, che restituisce l'elemento presente nella radice, avente quindi la scadenza più bassa. Subito dopo è, però, necessario richiamare una nuova funzione di percolazione dell'albero *"Percolate Up"*, questa volta con strategia inversa. Quest'ultima si occupa di riempire la posizione radice che è stata svuotata dalla funzione *"Extract"*, spostando verso l'alto i vari elementi dell'albero e di conseguenza fa sì che questo traslare verso l'alto un elemento, non lasci buchi nella struttura Heap; il tutto verificando ogni volta la proprietà di ordinamento della struttura, sulla base della grandezza delle chiavi.

Lo Heap, pertanto, può essere definito come una "coda di priorità" dove ogni elemento ha una posizione nella coda dettata dalla propria "velocità di ricorrenza".

Una volta estratto un elemento, viene chiamata la funzione ad esso associata. Per esempio immaginiamo, mediante la funzione *"Extract"*, di estrarre l'elemento *"Read_Sensor_1"*; questo elemento presenterà al suo interno un puntatore a funzione, che punta alla funzione *"Sensor_Reader_1"*. Questa funzione verrà chiamata e, dopo averla eseguita, ci si dovrà preoccupare di reinserire in coda l'elemento *"Read_Sensor_1"* così da poterlo rieseguire dopo un tempo dettato dalla sua velocità di ricorrenza.

Per fare ciò, l'elemento viene reinserito nello Heap, dopo aver sommato alla sua ricorrenza il valore corrente del timer di sistema; se così non

fosse la struttura ad heap non potrebbe funzionare, in quanto l'elemento con la ricorrenza più bassa sarebbe sempre nella radice dal momento che la funzione *Percolate Up* tenderebbe sempre a riportarlo in cima alla coda, non appena inserito.

```
void TimerDoStep(Timer* t) {
    Heap *h = &t->priorityQueue;
    while (h->pos && heap_Top(h)->val <= GETTIME())
    {
        HeapElement e = heap_Remove(h);
        int d = e.task->nextState(e.task);
        if (d) {
            e.val = GETTIME() + d;
            heap_Insert(h, e);
        }
    }
}
```

Il frammento di codice riportato sopra, rappresenta il loop di estrazione dei task e successivo reinserimento, effettuato dal timer allo scadere del tempo di attesa.

Si può notare come il reinserimento avvenga sommando il valore del timer di sistema a quello di latenza richiesto dal task.

Analizziamo in dettaglio un esempio di funzionamento, per meglio comprendere la strategia:

1. Inserisco A con chiave 100
2. Inserisco B con chiave 200
3. Chiamo la funzione Extract che mi restituisce A
4. Eseguo la funzione a cui punta A
5. Leggo il Timer del sistema (Timer = 400)
6. Reinserisco A con chiave 400 + 100
7. Chiamo Extract che mi restituisce B (ha chiave 200)
8. Eseguo la funzione dove punta B

9. Reinsiero B con valore 500+200 (ipotizzo 100 ms per fare le procedure)
10. Chiamo la funzione Extract che mi restituisce A (avente scadenza 500)
11. Eseguo A e lo reinsiero con valore 550 (Timer corrente) + 100
12. Chiamo la funzione Extract che mi restituisce A (avente scadenza 650)
13. Eseguo A....(B ha scadenza 700 sarà il prossimo)

Analizzando lo schema di esecuzione, si nota come, una volta entrato a regime, lo Heap restituisca due volte A ogni volta che viene eseguito B. Questo è corretto ed è conseguenza del fatto che A ha una velocità di ricorrenza pari alla metà di quella di B ($A = 100$, $B = 200$)

Grazie a questo sistema, abbiamo realizzato una struttura dati che ci assicura di eseguire una funzione con la ricorrenza da noi prescelta, senza perdere tempo ad eseguire funzioni che possano essere chiamate più raramente.

Qualsiasi processore ha la capacità di eseguire operazioni molto velocemente, ma solo in modo sequenziale. Pertanto, l'unico modo per simulare un parallelismo, è un sistema di ricorrenze, dove le priorità siano in qualche modo capaci di influenzare il tempo dedicato dal processore a ciascuna funzione. Avremo, quindi, funzioni con bassi tempi di latenza, che tenderanno ad impegnare il processore più frequentemente di altre con tempo di latenza più alto.

La struttura Heap è stata implementata nel nostro software ed è alla base del timer di sistema, che si occupa sia dell'esecuzione dei task che dell'architettura di rete. Il timer, infatti, deve essere in grado di gestire

sia ricorrenze nell'ordine del secondo, come quelle legate alla lettura dei sensori, che ricorrenze dell'ordine del millisecondo, come quelle relative alla ricezione dei pacchetti UDP dalla rete.

Rispetto al vecchio software, che utilizzava tre diversi timer¹² mantenuti in vita dal sistema operativo del PC, il nuovo sistema presenta un proprio mezzo di gestione del timer, che, preso il clock dalla CPU, si preoccupa della gestione degli eventi temporali, rispettando le code di priorità.

Grazie a questo nuovo sistema, è possibile variare le ricorrenze dei vari task in base alla necessità; un determinato task potrà infatti chiedere, dopo l'esecuzione, di essere reinserito con una latenza diversa dalla precedente, magari maggiore, se si ritiene che il dato controllo non sia necessario al momento.

In questo modo il sistema evita di svolgere compiti inutili, lasciando il processore libero per l'esecuzione dei task più importanti.

5.3 La comunicazione

Come precedentemente accennato, si è provveduto alla scrittura di due diversi software. Il primo, rappresentante il Roblet "Bioreattore", sarà il controllo del sistema e dovrà risiedere a bordo della scheda Wildfire, mentre il secondo, che ospiterà il Brain e la Bodymap, sarà un'interfaccia attraverso la quale sarà possibile controllare il sistema.

In $\mu TnetOS$ è stato necessario realizzare un'interfaccia di comunicazione che, basandosi sul protocollo di comunicazione UDP,

¹² *Avere tre timer in un sistema è un'astrazione che ci permette di fare il sistema operativo, il quale non fa altro che caricare nel proprio Heap tre eventi aventi ciascuno una ricorrenza pari a quella del clock di ciascun timer creato dall'utente.*

fosse in grado di inviare e ricevere messaggi XML dalla Bodymap ai Roblet e viceversa.

L'interfaccia UDP è stata realizzata appoggiandosi sulla libreria *Open TCP*, già presente con il kit di compilazione della scheda Wildfire, mentre è stato necessario, per la fase di debugging del sistema, riscrivere parte della libreria *Open TCP*, al fine di Emulare su PC, il funzionamento della scheda Wildfire.

È stato possibile, così, effettuare il debug del Roblet "*Bioreattore*" su PC, mediante Visual Studio. Senza emulare la libreria di rete, sarebbe stato necessario effettuare il debugging del software dopo il download sulla Wildfire, complicando significativamente l'intero processo.

Per quanto riguarda i messaggi XML si è provveduto invece alla scrittura di un generatore di codice, che generi funzioni per il riconoscimento, la serializzazione, e la deserializzazione dei messaggi XML necessari ad interagire con l'intera infrastruttura di Robotics4.NET. I messaggi sono stati dichiarati come tipi e il generatore, attraverso le API di reflection, effettua la generazione.

Per meglio comprendere il sistema, è necessario analizzare come è costituito un messaggio XML. Questi messaggi sono semplicemente dei messaggi di testo, formattati secondo regole ben precise, dettate appunto dallo standard XML.

Lo standard XML si basa sull'inserimento di particolari Tag nel testo, che rendano univoca la lettura e la comprensione del messaggio. Queste regole prevedono che i dati del messaggio siano incasellati in una struttura di tipo ad albero, dove ogni dato è univocamente identificato come appartenente ad un particolare campo, che può essere padre o figlio di un altro campo.

Riportiamo un esempio di linguaggio XML, così da facilitare la comprensione della struttura.

```
<?xml version="1.0"?>
<note>
<dest>Francesco</dest>
<mitt>Monica</mitt>
<oggetto>Promemoria</oggetto>
<corpo>questo fine settimana non mi dimenticare!</corpo>
</note>
```

La prima riga del documento, la dichiarazione XML, definisce la versione XML del documento. In questo caso il documento è conforme alla specifica 1.0 dell'XML.¹³

La linea seguente descrive l'elemento radice del documento (come ad es: "questo documento è un appunto"):

```
<note>
```

le 4 linee successive descrivono i 4 elementi figli della radice.

- "Dest" il destinatario del messaggio
- "mitt" il mittente del messaggio
- "oggetto" l'oggetto del messaggio
- "Corpo" il testo contenuto nel messaggio

```
<dest>Francesco</dest>
```

```
<mitt>Monica</mitt>
```

¹³ Standard utilizzato nel nostro software.

```
<oggetto>Promemoria</oggetto>  
<corpo>questo fine settimana non posso venire</corpo>
```

in chiusura l'ultima linea definisce la fine dell'elemento radice.

```
</note>
```

Tutti gli elementi XML devono avere un Tag di chiusura; in XML non è consentita l'omissione dei Tag di chiusura. (5)

L'utilizzo dei messaggi XML permette una trasmissione senza rischi di erronea interpretazione dei messaggi; in ascolto solo il task interessato proseguirà nella lettura ed, una volta incontrato un campo del messaggio corrispondente ad uno dei propri, potrà provvedere a copiarne il valore.

Se, per esempio, si vuol inviare un messaggio del tipo "Start pompa peristaltica" e per qualche problema il messaggio arrivasse al controllore solo come "Start", questo potrebbe essere scambiato per il comando di avvio dell'esperimento, con un conseguente grave errore nel controllo del sistema.

Con i messaggi XML questo non è possibile, in quanto messaggi incompleti non possono essere considerati.

A fini di esempio, riportiamo un pezzo di un messaggio XML utilizzato dal sistema $\mu TNetOS$.

```
<?xml version="1.0"?>  
<EmergencyStopMessage  
xmlns:xsi="http://www.w3.org/2001/XMLSchema-instance"  
xmlns:xsd="http://www.w3.org/2001/XMLSchema">
```



```
<Name><<NAME>></Name>
<RobletID><<ID>></RobletID>
<BrokerHost><<HOST>></BrokerHost>
<BrokerPort><<PORT>></BrokerPort>
<Type>Data</Type>
</Message>
```

I campi: NAME, ID, HOST e PORT verranno riempiti dal generatore prima dell'invio del messaggio.

Durante l'ascolto di un messaggio di questo tipo, è impossibile fraintendere, in quanto il roblet accetterà in ingresso solo ed esclusivamente messaggi formattati secondo lo standard dell'*Interfaccia di Comunicazione* (Passata dal Roblet al Brain all'avvio).

La sicurezza fornita dalla sintassi XML permette di ridurre i sistemi di controllo dell'errore di comunicazione, in quanto l'unica cosa che può succedere in presenza di un errore di comunicazione, è la mancata esecuzione del compito da parte del controllore, non essendo possibile scambiare un messaggio per un altro.

Grazie all'utilizzo dei messaggi XML si è potuto, quindi, utilizzare il protocollo di comunicazione UDP che, non avendo un controllo dell'errore, non garantisce la ricezione di ogni pacchetto inviato.

5.4 Architettura del software

L'architettura di $\mu TNetOS$ è diventata, durante la sua scrittura, sempre più complessa, dal momento che essa implementa un vero e proprio sistema operativo per microcontrollore, capace quindi di gestire il timer

di sistema, l'interfaccia di rete ed il sistema di controllo ed esecuzione task.

Analizzeremo, ora, i concetti che sono alla base di questo sistema, così da comprenderne meglio il funzionamento e l'organizzazione.

$\mu TNetOS$ è basato, come precedentemente accennato, su un timer di sistema, realizzato mediante una struttura Heap. Nel vettore dello Heap vengono inseriti degli elementi (*Heap_Element*) aventi ciascuno due campi: un valore di latenza in millisecondi ed un puntatore ad un *FSABase*.

Gli *FSABase* sono delle strutture dati appositamente realizzate durante la scrittura del software, in quanto, in linguaggio C, non sono implementabili gli oggetti; ogni *FSABase* comprende quindi un *Header* generico, uguale per tutti gli *FSABase*, che ne identifica la struttura ed un *Footer* che lo rende specifico e contiene i vari campi; queste strutture sono, quindi, molto simili agli oggetti del linguaggio C#.

Avremo, quindi, tante strutture di tipo *FSABase*, rappresentanti ciascuna un particolare automa del sistema, quale, per esempio, Sensore Pressione, Sensore Flusso, Etc.

Arrivati a questo punto, è bene chiarire come i vari sensori ed attuatori siano stati concettualmente organizzati.

Ogni *FSABase*, rappresenta appunto un automa; questa entità è rappresentata come una macchina a stati finiti. I vari stati dell'automa rappresentano le varie azioni che il determinato task deve svolgere ogni volta che viene "svegliato" e saranno per esempio, nel caso di un sensore:

- Stato 1 Leggo il sensore ed invio il messaggio contenente il dato
- Stato 2 Chiedo al timer di risvegliarmi fra 50 milli secondi

Stato 0 Mi rimetto nello stato di attesa.

Questo esempio si riferisce ad un sensore che ha una “vita” autonoma ed indipendente dal sistema e viene solo avvertito dal timer, che provvede a chiamarlo con una cadenza stabilita dal sensore stesso.

All’avvio, tutti gli FSABase vengono inizializzati nello stato 1 e, pertanto, provvederanno da soli a richiedere il proprio inserimento nella coda di esecuzione. Il timer, invece, deve essere creato ed inizializzato dal sistema che provvede a fare ciò mediante due funzioni: *Make_Controller* e *μTNetOS_Init* che vengono chiamate direttamente dal Main.

In questo modo il sistema è praticamente suddiviso nuovamente in una struttura brain – periferia, questo perché, grazie a questa struttura, è possibile simulare il parallelismo dei vari comportamenti, pur mantenendo il sistema stabile e sicuro.

L’architettura scelta rispecchia moltissimo l’architettura del nostro sistema nervoso. Come precedentemente accennato, il software sulla Wildfire rappresenta un’appendice dell’intero sistema, gestito appunto dal Brain.

Al suo interno, questo particolare Roblet bioreattore, ha una struttura analoga e provvede al controllo di vari automi, rappresentanti i vari sensori ed attuatori del sistema bioreattore.

Come nel nostro sistema nervoso, il cervello comunica, per esempio, con l’orecchio in modo bidirezionale; a livello dell’orecchio interno esistono però dei sistemi locali di feedback, capaci di regolare il guadagno di amplificazione del sistema degli ossicini, senza che il cervello debba controllare anche questo.

Questo tipo di architetture sono molto comuni all'interno dei sistemi viventi, in quanto, grazie alla decentralizzazione del controllo, è possibile risparmiare sulla potenza di calcolo necessaria per il controllo; si guadagna inoltre in sicurezza, in quanto il fallimento di un sistema di controllo periferico non può compromettere in alcun modo la stabilità del sistema, mentre, se questo fosse posizionato a livello centrale, avrebbe sicuramente provocato danni anche ai sistemi adiacenti.

Il sistema così strutturato si basa, quindi, su un'architettura di *time sharing*, basata su un *multitasking cooperativo*, grazie alla quale è possibile avere più processi in esecuzione parallelamente che siano in grado di condividere un unico processore in modo, dettato dalle esigenze del sistema.

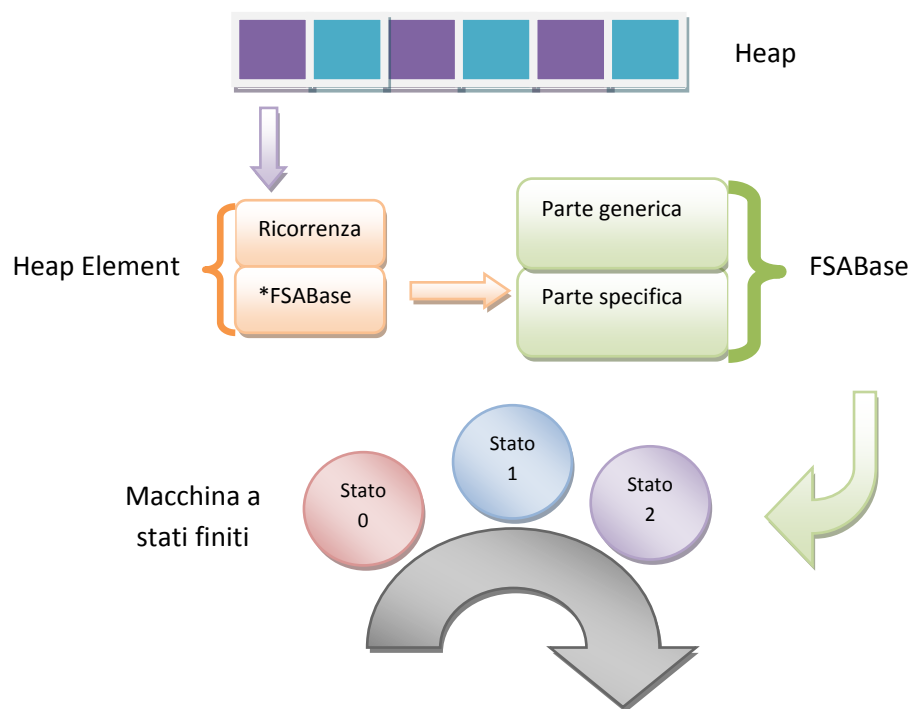


Figura 5-4: Grafico sintetico dell'architettura software.

Il software destinato all'esecuzione sul microcontrollore è scritto in linguaggio C, mentre l'interfaccia che verrà installata sul PC è scritta in

C#; si è provveduto, quindi, alla scrittura dei vari FSABase in codice C# e, mediante un generatore di codice da noi realizzato, si è provveduto alla conversione di questi “oggetti” C# in strutture scritte in codice C, così da poterli inserire nel listato del software destinato alla scheda di controllo Wildfire.

5.5 L’algoritmo di controllo del pH

Cuore del sistema di controllo del bioreattore, è l’algoritmo di mantenimento del pH. Grazie all’immissione di Aria o CO₂, il controllo può, infatti, interagire con la miscela innalzando od abbassando il pH.

In una coltura cellulare, normalmente, si tende a fornire aria in modo continuo, mediante un gorgogliatore posto nella camera di miscelazione.

L’aria fa sì che le cellule abbiano un corretto apporto di ossigeno e che possano pertanto sopravvivere all’interno della coltura. L’immissione di O₂ comporta, però, un lento ma costante innalzamento del pH, che viene contrastato con l’immissione di CO₂.

L’anidride carbonica, a differenza dell’ossigeno, interagisce con il tampone per la regolazione del pH in modo molto forte. Bastano quindi piccole quantità di CO₂ per comportare abbassamenti del pH notevoli. Questo sistema di regolazione del pH presenta, però, un grosso problema: la CO₂ tende ad abbassare il pH in modo molto più marcato di quanto l’ossigeno non tenda ad innalzarlo, ma, a differenza di quest’ultimo, interagisce con la soluzione dopo un intervallo di tempo decisamente lungo, nell’ordine dei 30 40 secondi.

Questo aspetto complica notevolmente il sistema di controllo, in quanto non è assolutamente possibile effettuare un controllo diretto in feedback, dal momento che si finirebbe inevitabilmente, come

accennato nei precedenti capitoli, per abbassare eccessivamente il pH della soluzione.

Si è pensato, quindi, di riscrivere il controllo del pH, prendendo spunto dal vecchio sistema, che si è rilevato essere molto funzionale, ma apportando delle modifiche, così da rendere l'algoritmo stesso configurabile dall'interfaccia utente.

Questo accorgimento permette una configurazione del bioreattore notevolmente più semplice, in quanto, in fase di testing, non sarà necessario ricompilare il software di controllo con le varie modifiche dell'algoritmo, ma sarà possibile passare le variabili di controllo volta volta mediante l'interfaccia.

Questo rappresenta una grande innovazione del sistema di controllo, in quanto l'utente esperto, dopo aver preso dimestichezza con il sistema, potrà decidere di cambiare le costanti dell'algoritmo, così da meglio adattarlo alle proprie esigenze o, per esempio, ad eventuali modifiche apportate al sistema di miscelazione.

L'algoritmo di controllo adottato si basa su un principio molto semplice: il software può scegliere solamente fra una delle due variabili di controllo sull'immissione di CO₂, che sono: durata dell'impulso e intervallo di tempo fra un impulso ed il successivo.

Ipotizziamo che si sia scelto di far controllare il pH con la strategia ad impulso di durata costante e variazione del tempo fra gli impulsi.

Il sistema legge con cadenza regolare il pH; se quest'ultimo rientra nella soglia di errore impostata dall'utente, il software immette aria. Non appena il pH supera la soglia di errore, viene immesso un impulso di CO₂ di durata prestabilita e costante.

La durata dell'impulso, non viene scelta dall'algoritmo, ma è una variabile che viene passata mediante l'interfaccia, ed ha comunque un valore di default, che evita all'utente non esperto di dover scegliere ogni volta.

Prima di effettuare qualsiasi azione, il controllore deve attendere per verificare se l'impulso immesso ha comportato o meno un cambiamento del pH; attende, quindi, un tempo impostato dall'utente come "First Delay Time". Il First Delay Time è il tempo che il sistema aspetta, dopo aver immesso il primo impulso di CO₂, prima di prendere una decisione.

Si possono verificare a questo punto due possibilità: il pH è tornato sotto la soglia di allarme, oppure il pH permane sopra il valore di allarme.

Nel primo caso il software continuerà ad immettere aria e il controllo pH attenderà un nuovo superamento della soglia prima di ridare un impulso di CO₂.

Nel secondo caso, invece, il controllore deve immettere un nuovo impulso di CO₂ di ampiezza costante e deve, però, ricalcolare il tempo di attesa prima della prossima azione.

È necessario ricalcolare il tempo di attesa, in quanto, se il pH non è tornato sotto il livello di guardia, si può presumere che questo stia salendo in maniera costante o che perlomeno sia stabile; in ambedue i casi non si può rischiare che questo salga troppo e, pertanto, la frequenza di controllo e azione deve aumentare, così da evitare un eccessivo innalzamento del pH.

Per calcolare il nuovo Delay Time, il software effettua un calcolo che, partendo dall'ultimo tempo di attesa, restituisce il prossimo tempo di

attesa, sottraendo in modo percentuale una quantità che dipenderà sia dalla differenza fra pH in cella e pH richiesto, che dalla velocità di crescita del pH.

La formula per il calcolo del Delay Time è la seguente:

$$TDelay(n) = TDelay(n - 1)[A(pH - pH^*) + B(pH(n) - pH(n - 1))]$$

Dove A e B sono costanti comprese fra 0 e 1; i termini che vanno a moltiplicare rappresentano, rispettivamente, il valore di superamento della soglia e la derivata del pH.

In questo modo si sottrae all'intervallo una percentuale dello stesso (all'istante precedente), avendo l'accortezza di fermare l'algoritmo una volta raggiunto un livello minimo del Delay Time, onde evitare di immettere CO₂ in modo continuo.

Il controllo, però, prima di immettere l'impulso di anidride carbonica, effettuerà due nuovi test: controllerà che il pH non sia ritornato sotto la soglia di allarme (se così fosse, eventualmente, annullerebbe l'immissione), ed effettuerà un controllo sulla derivata del pH nel tempo. Se la derivata del pH risultasse minore di zero, il sistema non immetterà CO₂, in quanto avere una derivata del pH minore di zero vorrebbe dire che il pH sta scendendo e, pertanto, fornire nuovi impulsi di CO₂, potrebbe comportare un eccessivo abbassamento del pH.

Nel caso in cui il pH sia fuori soglia ma la derivata sia minore di zero, il sistema attende e reimmette un impulso di CO₂ solo se la derivata torna maggiore o uguale a zero.

Analizziamo ora il diagramma di flusso dell'algoritmo, così da meglio comprendere il controllo implementato.

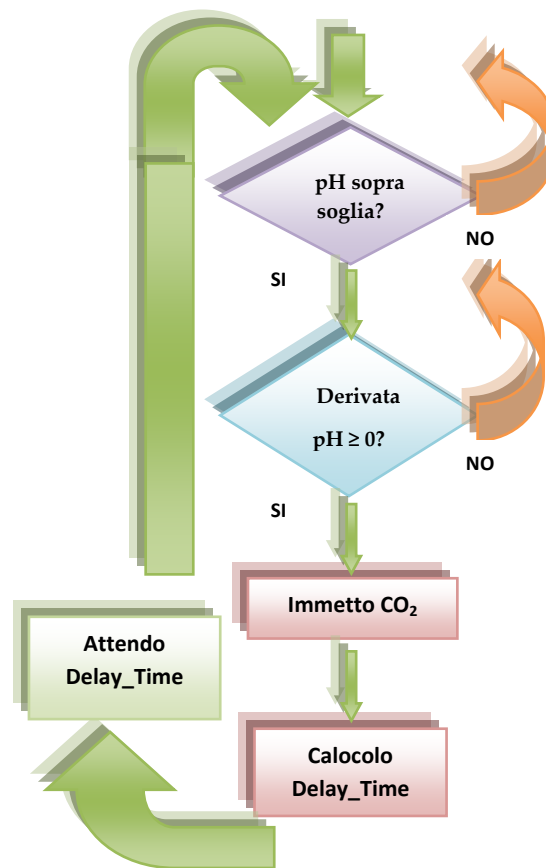


Figura 5-5: Diagramma di flusso controllo pH.

All'inizio del paragrafo avevamo accennato alla possibilità di scegliere il tipo di algoritmo da utilizzare; l'utente mediante l'interfaccia può scegliere, infatti, cosa l'algoritmo farà variare per poter mantenere il pH costante.

Si potrà, quindi, effettuare un controllo che immetta impulsi di CO₂ di durata costante e calcoli il tempo fra un impulso e l'altro (controllo analizzato precedentemente), oppure sarà possibile effettuare un controllo che, ad intervalli di tempo costanti, vada ad immettere in cella impulsi di CO₂ di durata diversa. La durata degli impulsi viene calcolata in base ad un'equazione del tutto simile a quella utilizzata per il calcolo del Delay Time, ma naturalmente avente le costanti A e B diverse.

5.6 L'interfaccia

Scritto il software di controllo del bioreattore, è stato necessario realizzare un'interfaccia utente, capace di esporre in modo semplice ed intuitivo tutte le funzionalità del sistema.

L'obiettivo principale che ci siamo prefissati durante la progettazione dell'interfaccia, è stato quello di rendere quest'ultima User Friendly.

L'idea era quindi di restituire, mediante il software, un'immediata immagine del funzionamento del sistema; per fare ciò si è deciso di suddividere le varie variabili del sistema in base alla loro tipologia, così da poterle in seguito rappresentare, nell'interfaccia, organizzate in vari sottogruppi.

Le variabili sono state quindi suddivise in:

Dati o variabili istantanee di sola lettura

Parametri di controllo o settaggio

Dati da visualizzare in modo continuo su grafici

Variabili istantanee	Parametri di controllo	Dati da visualizzare in continuo
pH	pH di lavoro	pH ultimi 30 minuti
Temperatura	Soglia di errore pH	Temperatura ultimi 30 minuti
Pressione in cella	Pressione di lavoro	Pressione ultimi 30 minuti
Flusso		Flusso ultimi 30 minuti
Giri pompa	Giri pompa desiderati	Giri pompa ultimi 30 minuti
Tensione di controllo regolatore di pressione		
Durata impulso CO2	Durata impulso CO2	
Ritardo fra inserimenti CO2	Ritardo fra inserimenti CO2	
Data ed ora di inizio esperimento		
Gas immesso		

Tabella 5-1: Tabella riassuntiva variabili interfaccia.

Si è proceduto, quindi, con la progettazione della struttura grafica, in modo che questa rispecchiasse l'organizzazione data alle variabili. Con questo accorgimento, è stato possibile rendere l'interfaccia immediatamente comprensibile e capace, quindi, di restituire all'utente un'immagine dello schema di funzionamento del bioreattore.

Analizziamo ora, aiutandoci con l'immagine sottostante, la struttura dell'interfaccia, così da meglio comprenderne la funzionalità e l'organizzazione.

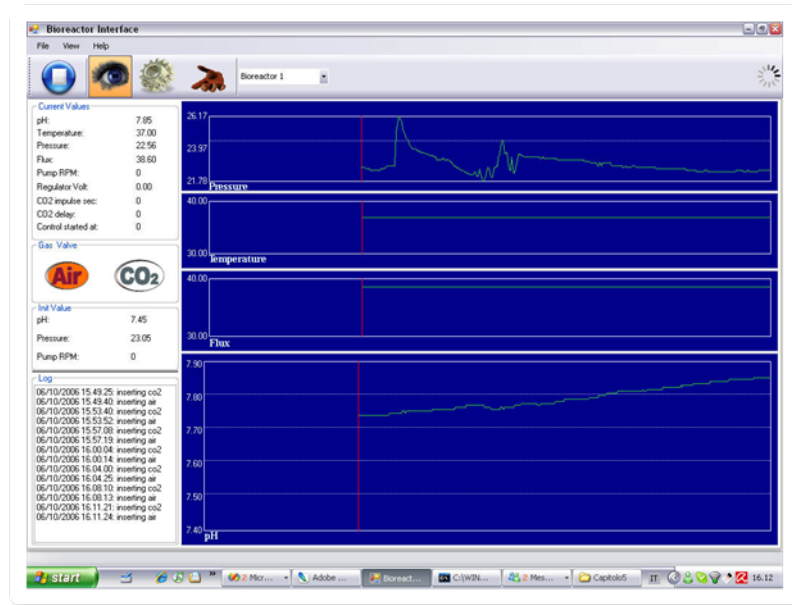


Figura 5-6: l'interfaccia nella modalità Viewer.

Possiamo osservare come l'interfaccia sia composta fondamentalmente da una barra dei bottoni posta in alto, al disotto della quale è inserito un pannello, dove è contenuta tutta la parte relativa alle variabili di sistema.

I pulsanti della barra sono suddivisi in gruppi grazie a dei separatori; da sinistra troviamo per primo il pulsante Start/Stop, utilizzato appunto per l'avvio o l'arresto dell'esperimento.

Percorrendo verso destra troviamo i pulsanti: *Viewer*, *Config* e *Manual*. Questi tre pulsanti servono per cambiare la modalità di lavoro dell'interfaccia, cambiando, di conseguenza, il contenuto del pannello sottostante.

Infine, spostandoci ancora verso destra, troviamo un menù a tendina che permette la selezione del bioreattore da controllare.

Nella parte destra della barra dei pulsanti, è stato infine inserito un piccolo *throbber*, al fine di restituire all'utente un feedback grafico sul funzionamento del sistema bioreattore; quest'ultimo è infatti in

rotazione solo durante la fase di Play dell'esperimento, mentre risulta statico nella fase di Stop.

Nella barra dei menù è presente, inoltre, un menù a tendina, grazie al quale è possibile selezionare il bioreattore da controllare. Questa ulteriore novità, presente nel software di gestione, rende il sistema un vero e proprio strumento di analisi High Throughput; è possibile, infatti, con un unico software, controllare contemporaneamente più bioreattori, rendendo quindi possibile il confronto diretto fra le varie cavie "virtuali".

All'avvio, l'interfaccia parte nella modalità Looking For (quella mostrata in Figura 5.7), dopo aver trovato sulla rete un bioreattore, passa automaticamente alla modalità Viewer. Nella modalità Viewer è possibile osservare, nei grafici, l'andamento delle variabili in esame quali: pH, Flusso, Temperatura e Pressione.

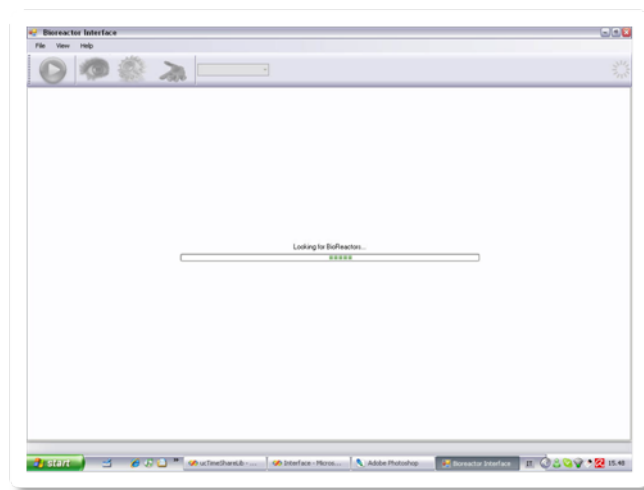


Figura 5-7: L'interfaccia all'avvio nella modalità Looking For.

Nella modalità Viewer è possibile, inoltre, ridimensionare a piacere i vari grafici, così da poter minimizzare quelli di minor interesse ed osservare alcune variabili in modo più dettagliato.

Alla sinistra dei pannelli contenenti i grafici è presente una sezione di riepilogo, contenente, nella parte alta, i valori istantanei delle variabili misurate (*Current Values*), seguiti da due spie indicanti il tipo di gas che in quel momento il bioreattore sta immettendo in cella (*Gas Valves*).

Al di sotto della sezione *Current Values*, è presente una sezione di riepilogo, riportante i dati di inizializzazione dell'esperimento quali: il pH, la Pressione ed il numero di giri della pompa peristaltica (*Init Values*). Infine è stato inserito un pannello di testo, chiamato Log, dove scorrono dei messaggi riguardanti le varie operazioni svolte dal bioreattore.

Per rendere più agibile la lettura del Log, è possibile ridimensionare verticalmente il pannello delle variabili, a discapito di quello dei grafici.

Premendo il pulsante *Config*, viene cambiata la modalità di lavoro dell'interfaccia, passando così nella modalità Configurazione.

In questa modalità, i grafici vengono sostituiti da una serie di controlli ed impostazioni, che permettono la configurazione sia dell'esperimento, che dei parametri di visualizzazione dell'interfaccia stessa.

E' in questa sezione che diventa possibile inserire i valori delle variabili che il bioreattore dovrà mantenere durante l'esperimento, regolare il tipo di algoritmo di controllo del pH ed inserire le relative costanti.

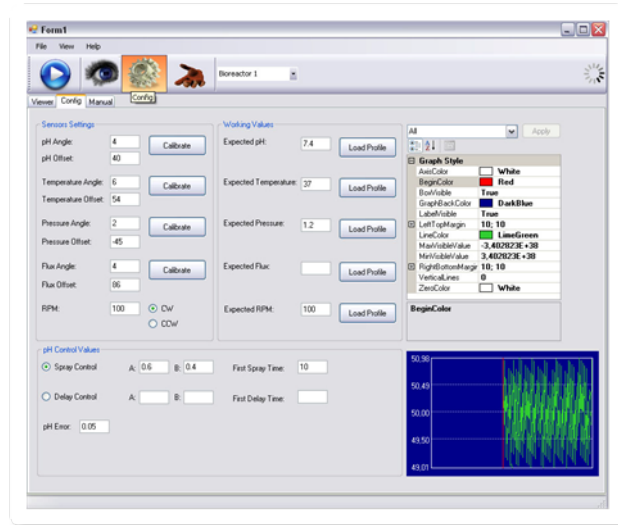


Figura 5-8: L'interfaccia nella modalità Config.

Anche in questo caso, le varie impostazioni sono state raggruppate, così da facilitare l'utilizzo dell'interfaccia, da parte degli utenti non esperti.

In alto a sinistra troviamo il gruppo di taratura dei sensori, con i relativi pulsanti di avvio per il Tool di taratura. A Destra di questo gruppo, è collocato il gruppo relativo all'impostazione delle variabili dell'esperimento; in questa zona vengono inserite le variabili che il sistema dovrà mantenere durante l'esecuzione dell'esperimento. È stato previsto, inoltre un pulsante per il caricamento dei profili, da far seguire alle variabili.

Sotto queste due sezioni, è presente la parte relativa alla configurazione del sistema di controllo del pH; mediante queste impostazioni è possibile scegliere il tipo di controllo da effettuare e, modificare le costanti relative ai due algoritmi.

Nella sezione destra è presente invece, la parte relativa alla configurazione grafica dell'interfaccia. In questa sezione è possibile selezionare i colori ed il tipo di visualizzazione dei grafici, osservando

in tempo reale le modifiche apportate, in un apposito grafico d'anteprima.

Premendo uno dei pulsanti Calibrate, della sezione Sensors Settings, l'utente avvia il tool di taratura dei sensori. Questo strumento è costituito da una semplice finestra, mediante la quale, l'utente è in grado di calibrare il sensore, in modo facile ed intuitivo. È sufficiente, infatti, comunicare al software il valore reale della variabile, misurata per almeno due valori distinti e possibilmente ben separati.

Il software provvederà, così, al calcolo della nuova pendenza ed offset della retta di taratura.

Con il precedente software era necessario, invece, leggere le tensioni in uscita dai sensori con il tool fornito dalla National Instruments e, mediante questi dati, calcolare la retta di taratura dei vari sensori. I valori così ricavati venivano poi inseriti in un file di testo chiamato *config.ini*, che il software provvedeva a leggere all'avvio.

Grazie alla nuova interfaccia, il sistema diventa un vero e proprio strumento di laboratorio, che non necessita di ulteriori strumenti per la propria taratura.

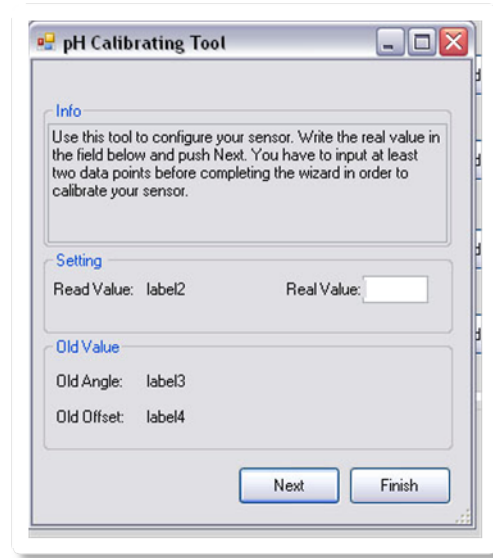


Figura 5-9: Tool di taratura sensori.

I pulsanti *Load Profile* aprono, invece, una finestra di dialogo, grazie alla quale è possibile caricare un file contenente l'andamento della variabile selezionata. In questo modo è possibile far seguire nel tempo, alle variabili controllate dal sistema, vari profili.

Mediante il pulsante *Manual* della barra, si accede invece alla terza ed ultima modalità della nostra interfaccia, la modalità *Manual Control*.

In questa modalità l'utente ha la possibilità di impostare manualmente il gas da immettere ed il valore di tensione sul regolatore, nonché il numero di giri della pompa peristaltica.

Quando si entra in questa modalità, il software mostra una finestra di avvertimento. In quest'ultima viene spiegato che, nella modalità *Manual Control*, il sistema smette di controllare il bioreattore così da lasciare all'utente una completa libertà di azione.

In questa modalità non è comunque possibile effettuare operazioni che comportino il danneggiamento del sistema, quale per esempio, l'impostazione di un valore di tensione eccessivamente alto sul regolatore di pressione.

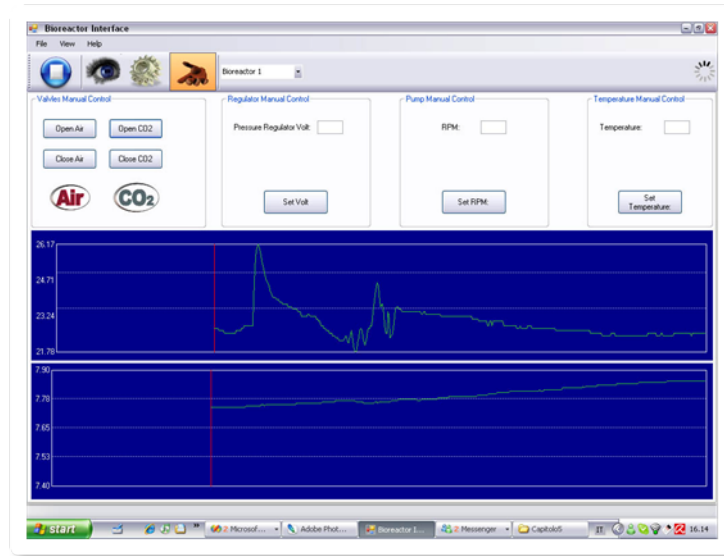


Figura 5-10: L'interfaccia nella modalità Manual.

Nella barra dei menù sono state, infine, inserite le classiche voci relative al salvataggio, esportazione e stampa dei dati. È disponibile, infatti, un sistema di esportazione dei dati, capace di salvare i profili tenuti dalle variabili durante l'esperimento in formato Excel o Csv, così da permetterne una facile analisi.

Il salvataggio dei dati avviene invece in automatico, in una cartella selezionabile mediante la modalità di configurazione; è però possibile decidere di salvare i dati in una nuova locazione, mediante l'apposita finestra di dialogo.

Una volta terminata la realizzazione della parte grafica relativa all'interfaccia utente, è stato necessario collegare quest'ultima alla bodymap.

Per fare ciò il Main dell'interfaccia è stato modificato in modo tale da poter caricare all'avvio la Bodymap. I messaggi della Bodymap sono stati, quindi, collegati alle varie variabili dell'interfaccia permettendo quindi una corretta visualizzazione e invio dei dati.

Di seguito riportiamo il Main dell'applicazione, al fine di poter meglio descrivere la strategia attuata per il caricamento della Bodymap con l'interfaccia.

```
using System;
using System.Collections.Generic;
using System.Windows.Forms;
using System.Threading;

namespace Interface
{
    static class Program
    {
        /// <summary>
        /// The main entry point for the application.
        /// </summary>
        [STAThread]
        static void Main()
        {
            Application.EnableVisualStyles();

            Application.SetCompatibleTextRenderingDefault(false);
            MainForm f = new MainForm();
            InteractiveMap im = new
InteractiveMap(f);
            Thread t = new Thread(new
ThreadStart(im.Run));
            t.IsBackground = true;
            t.Start();
            Application.Run(f);
        }
    }
}
```

Nel Main, è necessario creare un nuovo Thread, per gestire la contemporanea esecuzione della Bodymap e dell'interfaccia; questo thread necessita in ingresso di una variabile che rappresenti l'interfaccia stessa.

Questo passaggio è necessario, in quanto i due thread non possono direttamente comunicare fra loro, onde evitare conflitti. I due sistemi funzionano, quindi, nel seguente modo: la Bodymap avverte l'interfaccia di avere un messaggio in attesa per lei, e le chiede, quindi, di essere richiamata non appena sia possibile. L'interfaccia, al primo istante libero, chiama la Bodymap, che provvederà a comunicarle il messaggio.

Bibliografia

1. Microsoft Robotics Studio **Microsoft**. <http://msdn.microsoft.com/robotics/>. [Online] August 2006.
2. Increasing decoupling in a framework for programming robots. **Vincenzo Ambriola, Antonio Cisternino, Diego Colombo, Giorgio Ennas**. . Pisa : Dipartimento di Informatica, 2006
3. Robotics4.NET: Software body for controlling robots. **Antonio Cisternino, Diego Colombo, Giorgio Ennas, Daniele Picciaia**. . Pisa : Dipartimento di Informatica, 2006
4. *Heap*. **Wikipedia**. <http://it.wikipedia.org/wiki/Heap>, 2006
5. *La sintassi XML* **WebMaster Point**. http://www.webmasterpoint.org/xml_pratica/03.asp, 2006

Capitolo 6

Apparato elettronico

Come accennato nei precedenti capitoli, durante questo lavoro di tesi, si è provveduto alla sostituzione di una scheda di acquisizione dati National Instruments, con una nuova scheda di controllo modello Wildfire.

Cambiando gli apparati di acquisizione e controllo, è stato necessario adattare i segnali in uscita dal bioreattore, al fine di renderli compatibili con la nuova scheda di acquisizione utilizzata. Per fare ciò si è provveduto alla progettazione e realizzazione di un circuito elettronico di conversione del segnale, da interporre fra il bioreattore e la nuova scheda di controllo.

Il bioreattore, durante la sua precedente progettazione, è stato concepito per essere utilizzato con una scheda National Instruments, e pertanto, l'elettronica di lettura dei sensori è stata progettata in modo tale da utilizzare l'intero range dinamico di acquisizione delle suddetta scheda.

Queste schede di acquisizione segnali sono in grado di leggere segnali in ingresso aventi una dinamica compresa nell'intervallo ± 12 Volt, con una risoluzione di 12 bit.

Il bioreattore sfruttava, inoltre, il convertitore Digitale/Analogico della scheda National Instruments per il controllo in tensione del regolatore di pressione, ed è stato pertanto necessario includere, nell'apparato di conversione dei segnali, un convertitore D/A, da controllare in digitale, tramite la scheda Wildfire.

La scheda di controllo Wildfire accetta in ingresso tensioni comprese nell'intervallo 0 - 5 Volt; è stato, quindi, necessario realizzare un traslatore di livello, capace di portare il segnale con tensioni negative, presente in uscita dal bioreattore, in un intervallo interamente positivo e scarlo in seguito, per farlo oscillare nell'intervallo 0 - 5 Volt. Per realizzare questo tipo di traslatori, è necessaria un'alimentazione duale ± 12 Volt, al fine di alimentare correttamente gli amplificatori operazionali utilizzati nel circuito.

Si è provveduto, quindi, alla realizzazione dell'alimentatore duale ± 12 Volt ed, in seguito, è stato realizzato il circuito di adattamento del segnale.

Da un'accurata analisi dei segnali in uscita dal bioreattore, si è notato come in realtà non fosse necessario realizzare per tutti i sensori un sistema di adattamento del segnale. E' questo il caso del sensore di pressione, che si è visto avere un range di tensioni in uscita compreso fra 0 e 5 Volt e, pertanto già compatibile con la scheda Wildfire.

Anche il sensore di flusso non ha necessitato di un sistema di conversione del segnale, in quanto il suo range di valori è compreso nell'intervallo 2,96 - 5 Volt.

Pressione [mmHg]	Letture [V]	Flusso[SCCM ¹⁴]	Letture [V]
37.50	2.69	200	2.96
224.00	3.55	300	3.41
367.46	4.05	500	4.18
510.93	5.00	700	4.66
		900	4.90

Tabella 6-1: Lettura sensori pressione e flusso.

Per quanto riguarda invece il pH metro, si è notato come questo in realtà non sfrutti tutto il range dinamico ± 12 , ma arrivi a tensioni inferiori a -4 Volt solo in presenza di un pH superiore a 10, mentre restituisce tensioni superiori a 4 Volt con un pH di valore 4.

Visti i range di utilizzo del pH metro (i livelli di pH variano al massimo fra 6 e 8,5), si è deciso di non rimappare l'intero intervallo ± 12 Volt sull'intervallo leggibile 0 - 5 Volt, ma si è preferito piuttosto rimappare solo l'intervallo ± 4 Volt del segnale sull'intervallo 0 - 5 Volt leggibile dalla Wildfire.

Con questi accorgimenti abbiamo ottenuto un guadagno dal punto di vista della risoluzione di lettura, in quanto, in precedenza, veniva letto un intervallo di ± 12 e quindi 24 Volt con un convertitore A/D da 12 bit, con una conseguente risoluzione di 5,85 mV/bit, mentre, leggendo con un convertitore a 10 bit¹⁵ un intervallo di 5 Volt, si ottiene una risoluzione di 4,88 mV/bit.

¹⁴ SCCM Standard Cubic Centimeter per Second.

¹⁵ I convertitori A/D della scheda wildfire hanno una risoluzione di 10 bit.

pH	Volt
4	3,84
8	-1,20
10	-3,90

Tabella 6-2: Tabella pH - Tensione

Per quanto riguarda il sensore di temperatura, si è osservato come i valori in uscita varino da -3,2 Volt a -2,4 Volt (1). È stato, quindi, necessario rimappare il suddetto intervallo nel range di lettura 0 - 5 Volt della Wildfire ed, anche in questo caso, si è ottenuto un notevole aumento di risoluzione in lettura.

6.1 L'alimentatore duale

Per poter correttamente alimentare gli amplificatori operazionali utilizzati nel traslatore di livello, si è dovuto realizzare un alimentatore duale che, alimentato a 220 V AC, restituisca in uscita ± 12 V DC. Visto l'utilizzo dell'alimentatore in un circuito elettronico di adattamento del segnale, è stato necessario provvedere all'inserimento di uno stadio di stabilizzazione della tensione, atto alla riduzione del Ripple.

L'alimentatore in questione è stato realizzato utilizzando un trasformatore a presa centrale 220 - 12 Volt, collegato ad un opportuno ponte a diodi. Dopo il ponte a diodi sono stati inseriti 2 condensatori elettrolitici da 2200 μF , uno per ciascun polo.

Il segnale in uscita da questi condensatori risulta, pertanto, stabilizzato, ma presenta ancora un Ripple troppo elevato per poter essere utilizzato come alimentazione di un circuito elettronico per il trattamento del segnale.

Il trasformatore non garantisce, inoltre, un'uscita stabile a ± 12 Volt, ma spesso può capitare che il segnale in uscita superi i 12 Volt sul polo positivo e viceversa sia inferiore a -12 Volt sul polo negativo.

Per ovviare a questo problema, si è inserito, dopo i condensatori elettrolitici da $2200\mu\text{F}$, due regolatori di tensione, rispettivamente il 7812 per il polo positivo, ed il 7912 per il polo negativo. I regolatori di tensione provvedono a fissare la tensione in uscita rispettivamente a +12 V e -12 V, anche se la tensione in ingresso supera questi valori.

Per un'ulteriore riduzione del Ripple si è inserito, prima dell'uscita del segnale, due condensatori in parallelo per ciascun polo: uno elettrolitico da $470\mu\text{F}$ ed uno ceramico da 100KpF .

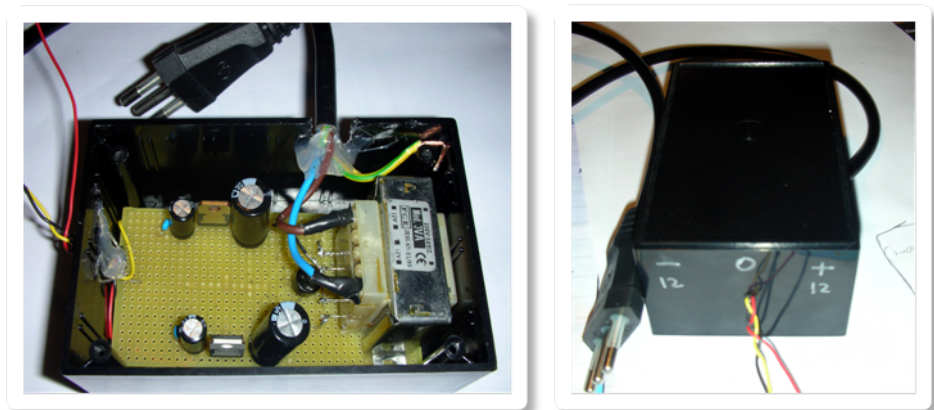


Figura 6-1: L'alimentatore duale.

L'alimentatore così realizzato ha dimostrato di avere una tensione in uscita, di tipo duale ± 12 Volt, con un Ripple molto basso e, pertanto, utilizzabile come alimentazione del circuito di conversione del segnale.

6.2 Circuito di adattamento del segnale

Il circuito di adattamento del segnale è stato progettato in modo tale da essere compatibile con l'adattamento dei segnali provenienti sia dal pH metro che del sensore di temperatura.

In questo modo è stato possibile realizzare due circuiti identici dove, mediante la regolazione di appositi trimmer, è possibile adattare il circuito al range dinamico del sensore in ingresso.

Il circuito è costituito dall'unione di quattro amplificatori operazionali, montati secondo varie configurazioni; i quattro amplificatori operazionali sono contenuti in un unico integrato, il *TL084*¹⁶.

Il circuito di adattamento del segnale prevede, al suo interno, la presenza di due buffer, uno posto in ingresso al fine di non influenzare l'elettronica di lettura dei sensori presente sul bioreattore, ed uno posto in uscita. Il buffer in uscita fa sì che il convertitore A/D della scheda di acquisizione non possa influenzare in alcun modo il funzionamento del circuito di condizionamento del segnale.

Il cuore del circuito di adattamento del segnale è un amplificatore operazionale, montato in configurazione invertente, sul cui ingresso positivo viene inviata una tensione di riferimento regolabile mediante un trimmer ed ottenuta mediante il collegamento di un partitore di tensione ad un amplificatore buffer.

In questo modo, agendo sul trimmer, si trasla verso le tensioni positive il segnale in ingresso, che andrà, quindi, ad oscillare nell'intervallo 0 - 8 Volt (il segnale in ingresso dal pH Metro è di ± 4 Volt).

È necessario, quindi, ridurre la dinamica del segnale di uscita, così da farlo variare nell'intervallo 0 - 5 Volt; per fare ciò, il segnale in uscita dall'amplificatore invertente viene inviato ad un trimmer, montato in configurazione a partitore di tensione. All'uscita del trimmer, è posto,

¹⁶ I Datasheet dei componenti utilizzati sono riportati in appendice B.

quindi, il buffer di uscita, che provvede alla replica verso l'esterno del segnale ridotto.

Si è notato, durante i test, che, in caso di disconnessione dei sensori dall'apparato di lettura, quest'ultimo può restituire tensioni in uscita nell'ordine dei -10 Volt. In questo caso il nostro traslatore di livello restituirebbe in uscita una tensione minore di zero, con conseguente rischio di danneggiamento della scheda di acquisizione.

Si è provveduto, quindi, all'inserimento di un diodo di protezione collegato a massa; in questo modo eventuali segnali in uscita aventi valori inferiori a 0 V, verranno cortocircuitati a massa, con conseguente taglio del segnale a 0 Volt.¹⁷

E' stato montato, inoltre, un ulteriore circuito tagliatore in alto, che limiti il segnale di uscita a 5 Volt in caso di sovratensioni. Il tagliatore è stato realizzato mediante un regolatore di tensione a 5 Volt, il 7805, collegato ad un diodo. In questo modo ogni volta che il segnale in uscita supera i 5 Volt, il diodo entra in conduzione, fissando il segnale di uscita al valore di 5 Volt imposto dal regolatore di tensione, ed evitando, quindi, di danneggiare il convertitore A/D della scheda wildfire¹⁸(2).

¹⁷ La progettazione del circuito è stata seguita dal Sig. Raffaello Francesconi.

¹⁸ Lo schema elettrico del circuito realizzato è riportato in Appendice.

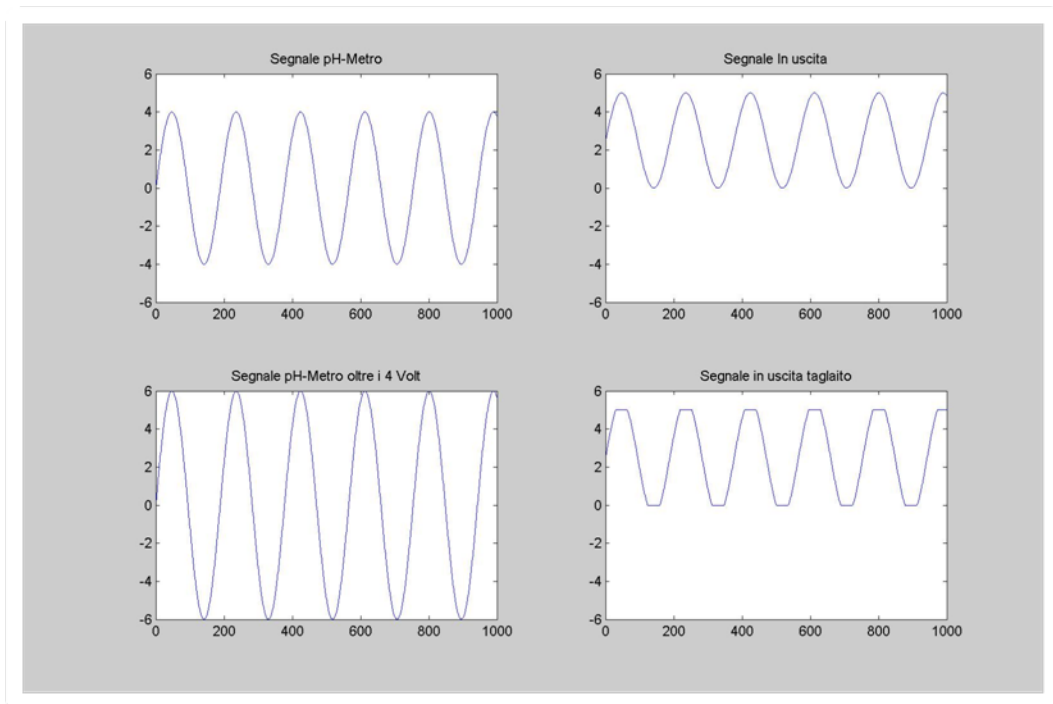


Figura 6-2: Segnali in ingresso ed uscita dal circuito di adattamento.

La figura precedente mostra i grafici relativi all'andamento del segnale in ingresso ed in uscita al circuito di condizionamento. Dai primi due grafici in alto, si può notare come un segnale in ingresso, avente dinamica compresa nell'intervallo ± 4 Volt, venga correttamente rimappato nell'intervallo 0 - 5 Volt, mentre nei due grafici in basso è riportato l'esempio di un segnale con dinamica ± 6 Volt, che viene tagliato in uscita dall'apposito circuito limitatore dopo essere stato rimappato dal convertitore di segnale.

6.3 Il convertitore Digitale Analogico.

Per controllare il regolatore di pressione contenuto nel case elettrovalvole, è stato necessario installare un convertitore D/A da collegare ad 8 pin digitali I/O della scheda Wildfire, in quanto quest'ultima non è fornita di un convertitore D/A.

Il convertitore D/A scelto è il *DAC0808* della National Semiconductor; questo componente necessita, per il suo funzionamento, di un'alimentazione duale ed in particolare di +5 e -12 Volt.

Il convertitore è stato, quindi, montato sulla stessa scheda del circuito di conversione del segnale, così da sfruttare le tensioni di alimentazione già presenti, ed in particolare, per la tensione di 5 Volt, ci si è collegati al regolatore di tensione utilizzato per la realizzazione del fissatore in alto.

Il DAC0808 è stato montato come da datasheet, mediante l'utilizzo di un amplificatore operazionale in configurazione transresistiva, collegato al terminale di uscita.

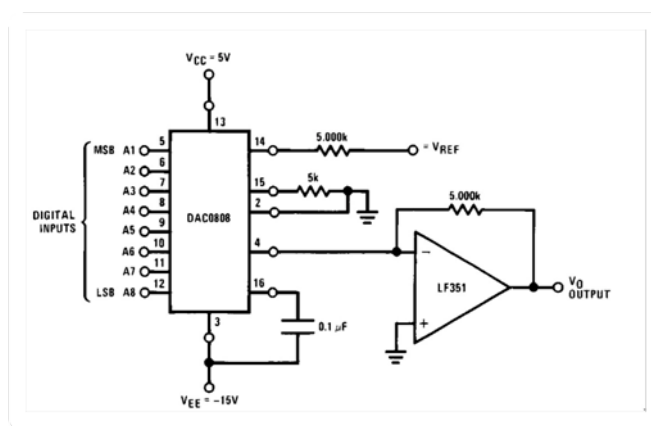


Figura 6-3: Schema di montaggio DAC0808.

La necessità dell'amplificatore operazionale è data dal fatto che il convertitore D/A utilizzato restituisce in uscita non una tensione, ma una corrente, dipendente dal valore degli 8 bit digitali in ingresso. Questa corrente viene, quindi, convertita dall'operazionale montato in configurazione transresistiva in una tensione, secondo un fattore di conversione regolabile mediante un apposito trimmer.

Come da schema di montaggio, è stato inserito, inoltre, un partitore sul segnale di riferimento alto del convertitore, così da poter regolare il range di tensioni sul quale far lavorare il convertitore D/A.(3)

I test effettuati sul circuito hanno dato ottimi risultati e, soprattutto, il convertitore D/A, montato nella suddetta configurazione, ha dimostrato una grande versatilità nell'utilizzo, dovuta alla possibilità di regolare il range di lavoro.

Dopo aver eseguito vari test si è optato, infine, per regolare il range del convertitore nell'intervallo 0 - 4 Volt; intervallo, questo, che si è dimostrato essere più che sufficiente per il controllo del regolatore di pressione.

Durante questi anni di test del bioreattore si è notato, infatti, che, in genere, si lavora con tensioni di controllo del regolatore di pressione, di circa 1 Volt e, raramente, si arriva a raggiungere i 2 Volt. Con tensioni superiori ai 2 Volt si ottiene, infatti, un'eccessiva formazione di schiuma all'interno della camera di miscelazione, con conseguente perdita di terreno.

Si è preferito, comunque, estendere l'intervallo di lavoro fino a 4 Volt, visto che con 8 Bit si ottiene una risoluzione di 15,6 mV/bit; risoluzione, questa, più che sufficiente per il controllo del regolatore.

In questo modo, si è preparato il bioreattore ad eventuali modifiche del sistema di distribuzione e gorgogliamento dei gas. Sarà possibile, quindi, in futuro, cambiare il sistema di miscelazione dei gas, senza dover modificare l'elettronica di controllo del regolatore.

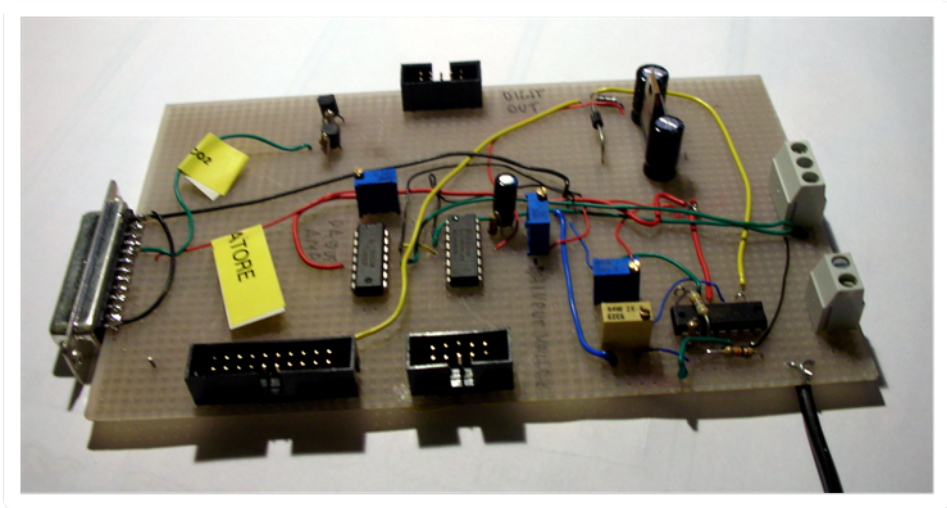


Figura 6-4: Scheda elettronica ospitante il circuito di condizionamento del segnale ed il D/A.

6.4 Collegamento del sistema

Per il collegamento fra la scheda Wildfire e l'elettronica di adeguamento del segnale abbiamo utilizzato degli appositi connettori multipolari da PCB. Si è scelto, invece, un cavo di tipo parallelo per il collegamento del case di controllo del bioreattore all'elettronica di conversione del segnale.

Il grafico sottostante mostra lo schema di collegamento del sistema.

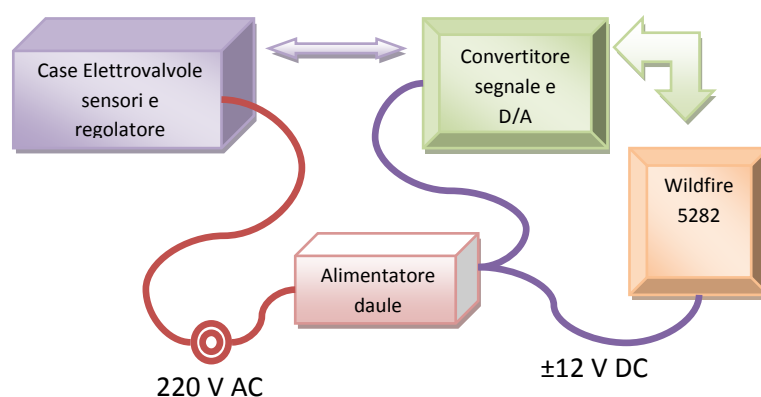


Figura 6-5: Schema di collegamento sistema elettronico.

In fase di test la scheda Wildfire, con la relativa elettronica di conversione del segnale, sono state lasciate all'esterno del case di controllo elettrovalvole, così da facilitarne la fase di debugging. Il collegamento fra la scheda di controllo ed il circuito di conversione del segnale, è stato effettuato mediante un connettore piatto a 10 poli, che collega direttamente gli 8 pin del convertitore A/D della scheda Wildfire con il sistema di conversione del segnale.

In questo modo, sulla scheda di conversione segnale, sono stati riportati tutti gli ingressi A/D della Wildfire, così da permettere, in futuro, una facile installazione di eventuali nuovi sensori.

Per quanto riguarda invece i Pin Digital I/O per il controllo del convertitore D/A, si è provveduto al collegamento diretto di una delle 3 porte digitali della Wildfire con il convertitore D/A installato sulla scheda mediante un connettore piatto a 10 Pin; uno dei due pin restanti è stato, quindi, utilizzato per il collegamento delle masse digitali.

I circuiti di apertura e chiusura delle elettrovalvole sono stati, invece, collegati alla scheda Wildfire mediante un circuito di Pull-Up, in quanto la scheda Wildfire ha uscite digitali in logica TTL, con una tensione di uscita pari a 3,3 Volt, mentre il circuito di apertura elettrovalvole necessita di una tensione d'ingresso di 5 Volt.

Per realizzare i Pull-Up sono stati utilizzati due BJT, montati sulla scheda di conversione del segnale e collegati alla tensione +5 Volt del tagliatore in alto.

Il controllo delle elettrovalvole viene effettuato mediante il collegamento dei Pull-Up alla seconda porta digitale della scheda Wildfire, anch'essa riportata interamente sulla scheda di conversione del segnale mediante un connettore piatto a 10 pin.

In figura 6.6 è mostrato il collegamento fra la scheda di conversione segnali e la scheda Wildfire, nonché l'alimentatore duale ed il collegamento Ethernet al PC; il collegamento al case elettrovalvole avviene, invece, mediante un cavo parallelo collegato fra il case di controllo e l'apposita porta presente sulla scheda di conversione segnali.

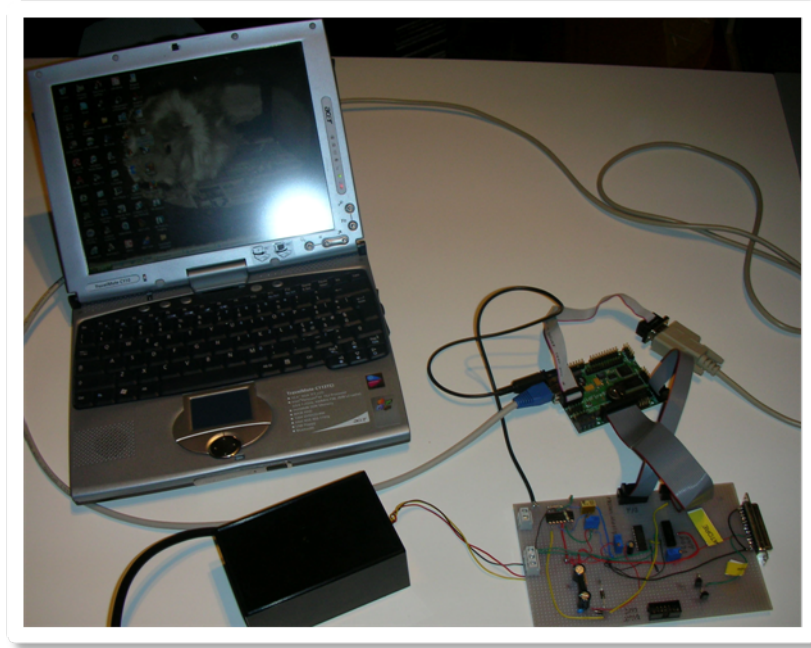


Figura 6-6: Sistema elettronico interamente collegato.

Bibliografia

1. Progettazione e realizzazione di bioreattori per la coltura cellulare in ambienti dinamici. **Rossi, Valerio** Pisa : Facoltà di ingegneria, 2002
2. *Fondamenti di Elettronica*. **Rashid, Muhamad H** Apogeo, 2000
3. *DAC0808*. 2004 **National Semiconductors**.

Capitolo 7

Risultati

Durante lo svolgimento di questo lavoro di tesi, numerosi sono stati i confronti fatti tra il vecchio ed il nuovo sistema. In questo capitolo, verrà effettuato un riepilogo dei cambiamenti apportati, così da evidenziare come questi abbiano notevolmente cambiato l'intero apparato di sperimentazione.

Verrà condotto un confronto sia sulle funzionalità che sui costi di realizzazione, così da dimostrare come i suddetti cambiamenti abbiano semplificato l'utilizzo, e preparato il sistema per una futura commercializzazione.

Per poter estrapolare i dati necessari al confronto, il nuovo sistema è stato testato presso l'istituto di fisiologia clinica del CNR, svolgendo un esperimento di mantenimento in vita di una coltura cellulare di fibroblasti in una cella a flusso laminare.

L'esperimento è stato condotto dagli stessi ricercatori che nei precedenti anni avevano utilizzato il bioreattore per svariati esperimenti, così da permettere una corretta valutazione comparativa dell'apparato.

Iniziamo, quindi, questa analisi dalla camera di miscelazione, per spostarci poi ad analizzare il sistema di riscaldamento e l'elettronica di controllo.

Infine verrà analizzato il software di controllo ed effettueremo il confronto tra i costi di realizzazione ed installazione del vecchio e del nuovo apparato.

7.1 La camera di miscelazione

La camera di miscelazione è stata completamente riprogettata e realizzata mediante una bottiglia in vetro di dimensioni adatte, calcolate grazie ad un apposito modello. La corretta valutazione delle dimensioni ha portato ad una notevole riduzione della quantità di terreno necessaria per gli esperimenti, con conseguente aumento delle performance in fase di analisi dei metaboliti secreti dalle cellule.

La nuova camera di miscelazione presenta, inoltre, al posto delle fragili cannule in vetro, un ago cannula che può essere facilmente sostituito se usurato.

Infine è bene ricordare come la camera sia collegata al nuovo sistema di recupero schiuma, che permette all'utente di poter eseguire esperimenti di lunga durata, senza rischiare che il sistema di ricircolo del terreno si svuoti.

Analizziamo ora in dettaglio le modifiche apportate.

<i>Camera di miscelazione</i>	<i>Vecchia</i>	<i>Nuova</i>	<i>Modifiche apportate</i>
Dimensioni	Eccessive	Corrette	Dimensioni calcolate con apposito modello. Nella vecchia camera si riduceva le dimensioni con una colata di PDMS.
Sterilizzabilità	Buona	Ottima	Possibilità di estrarre l'ago cannula.
Facilità di installazione	Media	Alta	Assenza parti fragili in vetro, tappo con tubi in silicone inglobati.
Funzionalità pH Metro	Buona	Buona	Installazione nuovo pH metro ad ago.
Rischi per l'utente	Pochi	Assenti	Le cannule in vetro sono state sostituite, l'ago cannula può essere inserito dopo la chiusura.
Tenuta pneumatica	Ottima	Ottima	
Facilità osservazione perdite	Bassa	Buona	Realizzazione box di riscaldamento in Plexiglas trasparente.
Recupero schiuma	Assente	Buona	Camera di recupero aggiunta con la nuova versione.

Tabella 7-1: Cambiamenti apportati alla camera di miscelazione.

Dalla precedente tabella possiamo facilmente osservare come le modifiche apportate a questa parte del sistema, abbiano decisamente aumentato le performance dell'apparato, sia dal punto di vista della qualità degli esperimenti che della sicurezza.

Possiamo notare come l'adeguamento delle dimensioni abbia portato ad un miglioramento della fase di analisi dei metaboliti secreti dalle colture; il terreno è stato ridotto, infatti, di circa 17 ml, con conseguente aumento della concentrazione dei metaboliti, di circa il 40%.

La sterilizzabilità del sistema è rimasta pressoché invariata, fatta eccezione per la possibilità di estrarre e sostituire l'ago cannula. In precedenza, con la presenza della cannule in vetro, si rischiava ad ogni installazione la rottura, con un conseguente inquinamento del terreno ed un notevole allungamento dei tempi necessari per l'avvio dell'esperimento.

Il pH metro è stato sostituito con uno di dimensioni ridotte, ma avente performance del tutto equivalenti; si è provveduto infatti, onde evitare problemi di incompatibilità elettronica, all'acquisto di un pH metro della stessa marca.

I rischi per l'utente sono stati notevolmente ridotti, in quanto sono state rimosse le fragili cannule in vetro e, soprattutto, grazie all'ago cannula, è adesso possibile chiudere la camera di miscelazione senza rischi ed inserire quindi l'ago dopo la chiusura.

Grazie alla realizzazione del nuovo sistema di riscaldamento High Throughput in Plexiglas trasparente, è possibile osservare facilmente eventuali versamenti di terreno, in quanto quest'ultimi andrebbero a colorare il liquido di riscaldamento. Nella precedente versione era impossibile fare ciò, in quanto le camere di miscelazione venivano

inserite direttamente nel bagnetto termostatico, rendendo impossibile l'osservazione del terreno inserito all'interno.

Un'ulteriore miglioramento apportato al sistema, è dato dalla presenza della camera di recupero schiuma. Quest'ultima, infatti, permette un notevole allungamento della durata degli esperimenti. È adesso possibile recuperare il terreno fuoriuscito per schiumatura, evitando quindi uno svuotamento del sistema di ricircolo.

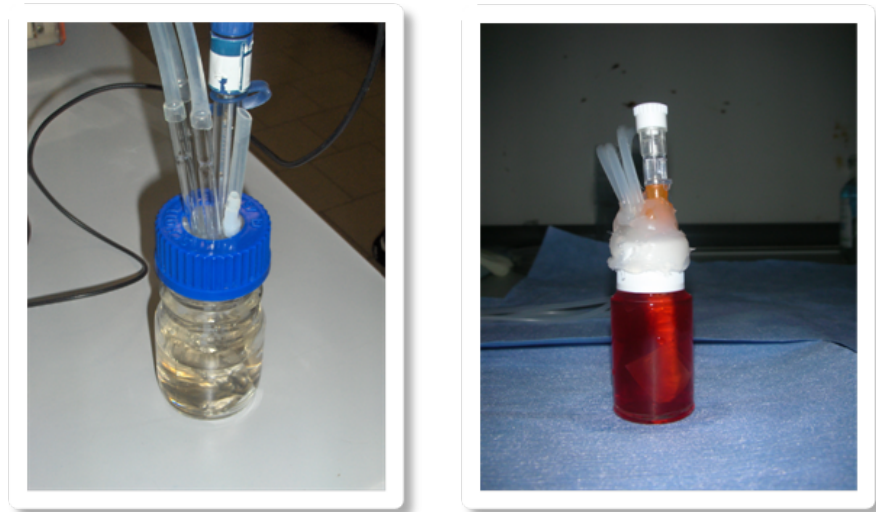


Figura 7-1: Confronto fra vecchia e nuova camera di miscelazione.

7.2 Il sistema di riscaldamento

Analizziamo adesso, mediante l'utilizzo di una tabella, le modifiche apportate al sistema di riscaldamento del bioreattore.

<i>Sistema di riscaldamento</i>	<i>Vecchio</i>	<i>Nuovo</i>	<i>Modifiche apportate.</i>
High Throughput	No	Si	Quattro bioreattori riscaldati da un unico bagnetto.
Dimesioni ed ingombro	Grandi	Medie	Utilizzando un unico bagnetto per si riducono notevolmente le dimensioni.
Efficienza	Buona	Buona	Il principio di riscaldamento è rimasto invariato.
Facilità di installazione	Media	Alta	Collegando due tubi al bagnetto il sistema è pronto per inserirvi le camere di miscelazione.
Possibilità di modifica	Nessuna	Buone	Il nuovo sistema si presta alla realizzazione di apparati di riscaldamento alternativi

Tabella 7-2:Modifiche apportate al sistema di riscaldamento.

Dall'osservazione della precedente tabella, è immediato comprendere come la realizzazione di un sistema di riscaldamento dedicato per le camere di miscelazione, abbia notevolmente cambiato l'organizzazione dell'intero sistema bioreattore. È adesso possibile, con un unico bagnetto termostatico, riscaldare fino a quattro bioreattori, con conseguente riduzione degli spazi necessari all'installazione dell'apparato e, soprattutto, dei costi.

Grazie alla realizzazione di un sistema dedicato, è possibile, adesso, apportare ulteriori modifiche, atte al miglioramento del sistema di riscaldamento. Sarà possibile, in futuro, dotare il box di riscaldamento di una serpentina impermeabile, così da permettere il riscaldamento del sistema, senza l'utilizzo del bagnetto termostatico.

Le modifiche apportate a questa parte del sistema hanno semplificato molto le fasi di installazione, in quanto, adesso, basta collegare al bagnetto i tubi di ricircolo dell'acqua ed inserire le camere di

miscelazione nel box. In precedenza, invece, bisognava inserire la camera di miscelazione nel bagnetto termostatico, avendo cura di bloccare quest'ultima, in modo da impedire eventuali rovesciamenti durante l'esecuzione dell'esperimento. Nella precedente versione, si potevano inserire, in un unico bagnetto, al massimo due camere di miscelazione, mentre, nel nuovo sistema, un unico bagnetto riscalda quattro camere.

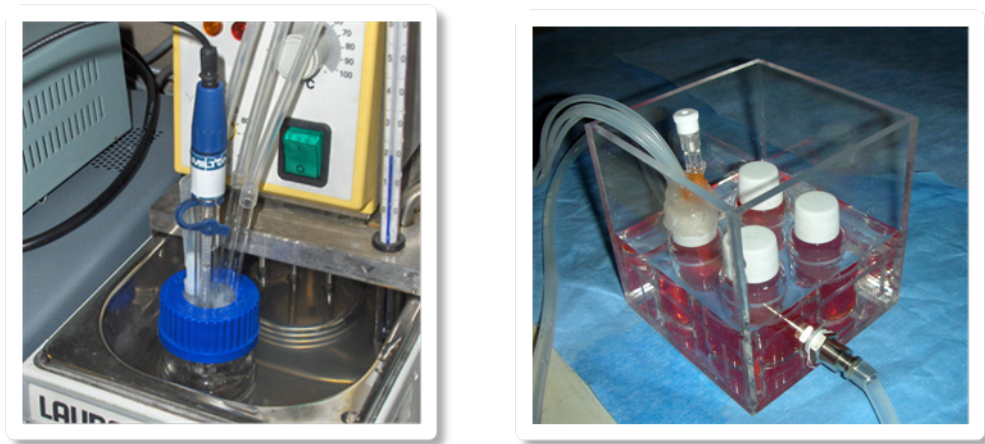


Figura 7-2: Confronto fra i due sistemi di riscaldamento.

7.3 L'elettronica di controllo

L'elettronica di controllo ed il software di gestione del bioreattore sono state le parti del sistema sottoposte ai cambiamenti più sostanziali. Grazie a queste modifiche, il sistema è diventato un vero e proprio macchinario da High Throughput Screening; inoltre è stato trasformato da periferica di un PC ad entità autonoma.

Il sistema precedente prevedeva che il controllo fosse effettuato da un PC, mentre, con il nuovo apparato, il computer funge solamente da visualizzatore; il controllo è completamente trasferito a bordo del bioreattore stesso.

<i>Electronica di controllo</i>	<i>Vecchia</i>	<i>Nuova</i>	<i>Modifiche apportate</i>
High Throughput	No	Si	E' possibile adesso collegare ad un unico PC svariati bioreattori
Compatibilità multiplatforma "Hardware"	No	Si	Il sistema precedente prevedeva l'utilizzo di una scheda National Instruments, adesso è possibile legger con qualsiasi convertitore A/D.
Facilità di utilizzo	Bassa	Alta	La presenza della nuova scheda di controllo elimina la necessità di installare driver specifici, adesso il collegamento è tramite porta Ethernet.
Risoluzione	Buona	Alta	L'alta risoluzione della scheda National Instruments non veniva correttamente sfruttata, l'intervallo di lettura è stato rimappato.
Velocità di campionamento	di Eccessiva	Adeguate	E' stata ridotta la velocità di campionamento perchè sovradimensionata.
Possibilità di memorizzazione embedded	di Assente	Fino ad 1 Gb	Il sistema è adesso in grado di accumulare dati fino ad 1 Gb senza l'ausilio di un PC.
Controllo autonomo	Assente	Presente	Il sistema è completamente autonomo e comunica con il PC solo per la configurazione e l'esportazione dati.
Possibilità di modifica	Alcuna	Ottima	E' possibile cambiare facilmente scheda di controllo o software di gestione.
Collegamenti	Dedicati	Universali	Invece degli appositi connettori della National Instruments, viene utilizzato un comune cavo Ethernet
Back compatibilità	--	Presente	E' tutt'ora possibile collegare il sistema al vecchio apparato elettronico.

Tabella 7-3: Modifiche apportate all'apparato elettronico.

L'apparato di controllo elettronico del sistema è stato praticamente rivoluzionato. La sostituzione della scheda National Instruments ha portato il sistema a diventare più versatile; è adesso possibile collegare, mediante la porta Ethernet, l'apparato ad un qualsiasi PC, senza che questo debba necessariamente aver installato i driver specifici National Instruments.

La comunicazione fra l'interfaccia ed il bioreattore avviene, infatti, mediante pacchetti UDP. Quest'ultimi sono compatibili con qualsiasi

architettura di rete e danno la possibilità di controllare il sistema da remoto, attraverso rete locale o Internet.

Il nuovo sistema, essendo autonomo, è diventato un vero e proprio apparato High Throughput. È possibile, infatti, collegare svariati¹⁹ bioreattori ed osservarli mediante un'unica interfaccia, selezionando, grazie all'apposito menù, il sistema da controllare.

Le modifiche apportate hanno, inoltre, aumentato la risoluzione di lettura dei sensori, in quanto il range di lavoro di questi ultimi, è stato adattato a quello di lettura del controllore, con conseguente aumento di risoluzione. La velocità di campionamento è stata ridotta poiché ritenuta sovradimensionata per le esigenze del sistema. Una velocità di campionamento di 200 campioni per secondo è, infatti, notevolmente superiore alle necessità di controllo di un sistema bioreattore, che vede al suo interno dinamiche di tipo biologico, aventi andamenti tipici nell'ordine del secondo. La nuova frequenza di campionamento è stata settata quindi ad un campionamento ogni 64 μ secondi, corrispondenti a circa 15 campionamento al secondo

Grazie al nuovo sistema, è possibile, adesso, memorizzare fino ad un Giga byte di dati direttamente a bordo del controllore, mediante l'utilizzo di una scheda SD. È possibile, quindi, poter scollegare il sistema dal PC, dal momento che, oltre ad essere autonomo, il nuovo apparato ha la possibilità di salvare i dati dell'esperimento e poterli inviare in seguito all'interfaccia per la visualizzazione.

La vera rivoluzione del sistema è, però, nell'autonomia di quest'ultimo. Il bioreattore è adesso un macchinario autonomo, capace

¹⁹ Il numero dei bioreattori collegabili dipende solo dagli IP disponibili sulla rete, il sistema è stato comunque ottimizzato per l'utilizzo con quattro bioreattori.

di prendere decisioni al fine di mantenere in vita le colture cellulari nel miglior modo possibile.

Il PC diventa un semplice “telecomando/visualizzatore” del sistema, mediante il quale è possibile avviare l’esperimento, modificare i parametri di lavoro e visualizzare i dati.

Le modifiche apportate a questa parte del sistema hanno reso il bioreattore pronto per ulteriori modifiche future; precedentemente questo poteva risultare un compito arduo, in quanto, l’elettronica dei sensori, risultava essere progettata per un utilizzo con schede da analisi dei segnali, molto difficili da interfacciare e di costo elevato.

Grazie allo stadio di adattamento dei segnali realizzato, è adesso possibile, collegare il bioreattore a qualsiasi microcontrollore o scheda di acquisizione, permettendo in futuro una facile modifica del sistema.

Infine è bene sottolineare come l’abbandono di una scheda del tipo National Instruments abbia permesso di sostituire tutti i collegamenti effettuati con cavi di tipo dedicato, con sistemi di collegamento universali, quali lo standard RJ-45 delle porte Ethernet, facilmente reperibile in commercio, di basso costo e di facile installazione.

Tutte le modifiche apportate all’apparato elettronico sono state progettate in modo tale da essere perfettamente compatibili con il vecchio sistema. L’apparato di conversione dei segnali è stato, infatti, montato in serie fra il circuito di lettura sensori e la nuova scheda di controllo, così da permettere un facile collegamento del sistema alla scheda National Instruments precedentemente utilizzata.

Questo accorgimento è stato dettato dall’esigenza di non interrompere esperimenti in corso con il precedente sistema e dare quindi la possibilità,

ai ricercatori, di poter familiarizzare gradualmente con il nuovo apparato.

7.4 Il software

Tutti noi, nell'utilizzare un macchinario, tendiamo a classificarlo in base alla sua versatilità e facilità di utilizzo piuttosto che per le sue performance.

Numerosi sono al giorno d'oggi gli esempi di macchinari precisi, molto sofisticati ma impossibili da usare, che vengono inevitabilmente abbandonati e sostituiti da altri meno performanti, ma di più semplice utilizzo.

Il sistema bioreattore aveva in qualche modo lo stesso problema; era facilmente utilizzabile solo dai propri realizzatori, in quanto quest'ultimi ne conoscevano il funzionamento interno.

Agli occhi di un utente inesperto, il sistema tendeva ad apparire come molto complicato ed inutilizzabile. Il vecchio software richiedeva all'utente molti parametri di controllo, presumendo, quindi, una dettagliata conoscenza dell'architettura interna.

Alcuni di questi parametri, quali, ad esempio la minima tensione di comando del regolatore di pressione, tendevano inevitabilmente a disorientare il ricercatore che si trovasse ad utilizzare il sistema, il quale finiva per abbandonare l'apparato, in quanto ritenuto troppo complesso. Usciti dalla fase di testing del sistema, è possibile fortunatamente risolvere questo tipo di problemi; moltissime variabili di controllo del sistema possono ora essere mascherate all'utente, dal momento che erano state inserite nell'interfaccia per facilitare la fase di test dell'apparato.

Come accennato nei precedenti capitoli, il nuovo software è stato progettato così da essere il più intuitivo possibile; l'organizzazione delle variabili stesse è stata fatta in modo da fornire all'utente un'immagine mentale dell'architettura interna del sistema.

Questo non vuol dire che si sia tolta all'utente la possibilità di interagire col sistema a basso livello. L'interazione a basso livello è tutt'ora disponibile e risulta più delicata ed efficiente; ma prima di poter accedere alla sezione di controllo manuale, il software avverte l'utente dei rischi che tale operazione potrebbe comportare.

A tal proposito, è bene ricordare come, nella precedente versione, l'algoritmo di controllo del pH, fosse invisibile all'utente, poiché quest'ultimo era stato inserito in una libreria ormai compilata. Nel nuovo sistema invece, l'utente potrà decidere il tipo di algoritmo per il controllo del pH, ed impostare manualmente le relative costanti. Questo tipo di controllo a basso livello, è, però, presente nella sola sezione di configurazione e non obbliga pertanto l'utente alla conoscenza dell'architettura interna del sistema. L'interfaccia partirà, infatti, con una serie di valori di default, impostati durante la fase di testing e taratura del nuovo apparato, sufficienti per il corretto svolgimento dell'esperimento.

Un'ulteriore innovazione dell'interfaccia è rappresentata dalla presenza dei messaggi di errore e dagli avvertimenti inseriti prima dell'accesso alla sezione di controllo manuale; nella precedente versione l'utente poteva tranquillamente accedere alla parte di controllo manuale, senza alcun avvertimento; questo perché, durante la fase di test del prototipo, era necessario accedere spesso alla modalità manuale e si

preferì, pertanto, non inserire alcun messaggio di avvertimento, così da snellire le procedure di settaggio del sistema.

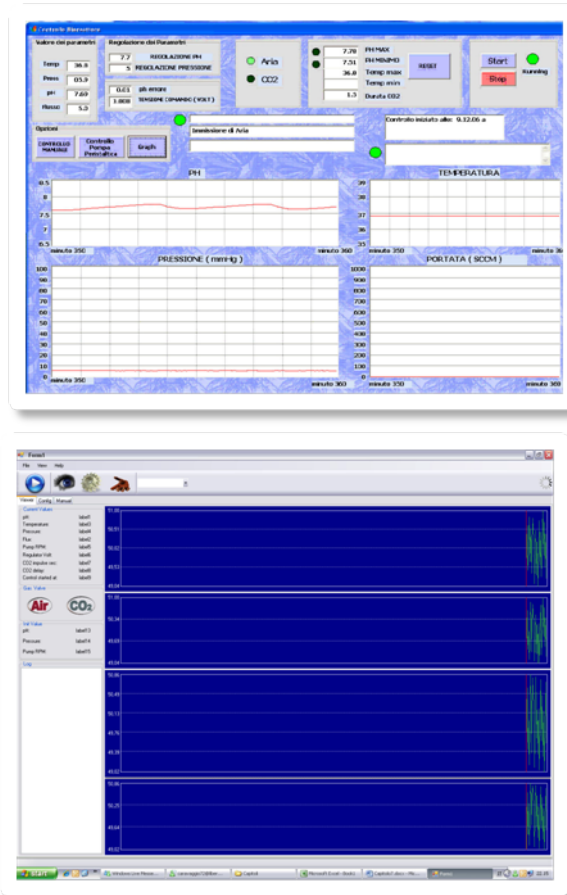


Figura 7-3: Screen shoot delle due interfacce grafiche.

La figura precedente mostra due screen shoot delle rispettive interfacce grafiche; si può notare come, già a prima vista, le due abbiano caratteristiche completamente diverse.

A tal proposito, un altro punto da affrontare, è quello relativo alla cura dell'aspetto grafico; nella precedente versione, questo aspetto del software non era stato minimamente preso in considerazione. Con la nuova interfaccia invece, si è deciso di curare molto la parte grafica, al fine di rendere il software non solo di piacevole utilizzo, ma soprattutto simile ai più comuni software disponibili sul mercato. In questo modo si evita all'utente la spiacevole sensazione di disorientamento che si

prova quando si è posti di fronte ad un software avente uno stile mai visto prima e dove risulta, pertanto, difficile effettuare anche la più banale delle operazioni.

7.5 Analisi dei costi.

Dopo le modifiche apportate durante questo lavoro di tesi, il bioreattore è diventato a tutti gli effetti uno strumento di laboratorio. È essenziale, pertanto, effettuare un'analisi dei costi di realizzazione del sistema, così da meglio evidenziare come queste modifiche abbiano reso l'intero apparato più funzionale, ma soprattutto facilmente commercializzabile. Di seguito è riportata una tabella riassuntiva dei costi di realizzazione del sistema, ipotizzando l'installazione in un laboratorio di un apparato di sperimentazione High Throughput composto da quattro bioreattori.

<i>Blocco del sistema</i>	<i>Note</i>	<i>Vecchio sistema</i>	<i>Nuovo sistema</i>	<i>Risparmi o parziale</i>
Gruppo di controllo elettrovalvole	4 gruppi separati da circa 7000 € ciascuno.	28000 €	28000 €	0
<i>Sistema di riscaldamento</i>				
Bagnetto termostatico	Almeno 2 per il vecchio sistema, uno solo per il nuovo. Ciascuno costa circa 1500 €.	3000 €	1500 €	1500 €
Box di riscaldamento multiplo	Inserito nella nuova versione.		100€	-100 €
<i>Sistema di controllo</i>				
Scheda di controllo	Una scheda per ciascun bioreattore. La scheda National Instruments costa 1249 €, la scheda Wildfire 200 €.	4996 €	800 €	4196 €

PC	Un solo PC con il nuovo sistema. Quattro con il vecchio. Si ipotizza un costo medio di 1000 € per ogni PC con monitor.	4000 €	1000 €	3000 €
Scheda di adattamento segnali	Presente solo nel nuovo sistema. Si considera 100 € di costo fra componenti ed assemblaggio.	0 €	100 €	-100 €
Pompa peristaltica	Una sola pompa è sufficiente per quattro bioreattori.	2000 €	2000 €	0 €
TOTALE		41996 €	33500	8496

Tabella 7-4: Riepilogo costi.

Dall'osservazione della tabella costi si può evincere come vi sia, fra i due sistemi, una differenza nei costi di realizzazione di circa 8500 €. La precedente tabella è stata realizzata simulando l'installazione di un sistema bioreattore High Througput composto da quattro elementi. Questo sistema è capace di simulare, quindi, fino a quattro cavie virtuali.

Per installare in un laboratorio un apparato di questo tipo, è necessario acquistare quattro sistemi di controllo delle elettrovalvole, sia con il vecchio che con il nuovo sistema. La differenza la troviamo, invece, nel sistema di riscaldamento, capace adesso di riscaldare contemporaneamente fino a 4 camere di miscelazione. Con il vecchio sistema bisognava disporre di almeno due bagnetti termostatici dove inserire le camere di miscelazione.

Il grande risparmio lo troviamo nella realizzazione dell'apparato di controllo del sistema. Con il vecchio bioreattore era necessario disporre di un PC per ogni bioreattore, mentre, con il nuovo sistema, è possibile controllare più bioreattori contemporaneamente da un unico PC. Considerando una spesa media di 1000 € per ogni PC Desktop con monitor, si ottiene un risparmio di 3000 €. La sostituzione della scheda

National Instruments con la nuova scheda Wildfire ha portato ad un ulteriore risparmio di circa 4200 €; con una conseguente riduzione dei costi, per il solo apparato di controllo, di circa 7100 €.

Grazie a questo lavoro, abbiamo ottenuto, quindi, un miglioramento delle prestazioni dell'intero apparato di sperimentazione, pur riuscendo ad abbattere i costi di realizzazione del prodotto. Il bioreattore si presenta adesso, come un perfetto sistema da laboratorio ed è, quindi, pronto per una futura commercializzazione.

Con l'adattamento del sistema elettronico sarà possibile, in fase di commercializzazione, ridurre ulteriormente i costi di realizzazione del sistema. Infatti è adesso possibile collegare il bioreattore ad un qualsiasi convertitore A/D e, quindi, non è più richiesta la presenza di schede molto costose e particolari, quali le National Instruments.

Il risparmio calcolato con la precedente tabella, se visto in modo puramente economico, non mostra però correttamente quali siano i veri punti di forza del nuovo sistema. Con il nuovo apparato infatti, il PC utilizzato per il controllo, non deve essere più un PC dedicato al solo bioreattore, ma può essere un qualsiasi computer utilizzato per svolgere altri compiti. Questo perchè il sistema non richiede potenza di calcolo o sistemi di back-up dei dati, dal momento che il controllo e la memorizzazione dei dati sono svolti dal bioreattore stesso.

Grazie al collegamento di rete, sarà possibile controllare il sistema dall'ufficio o da casa, senza andare in laboratorio, con conseguente riduzione dei costi umani, legati agli esperimenti con il bioreattore.

Infine il nuovo sistema di allarme integrato nel software, permetterà una riduzione del numero degli esperimenti falliti per problemi legati a perdite del circuito o simili, con un ulteriore riduzione dei costi.

Conclusioni

Questo lavoro di tesi nasce dall'esigenza di fornire, alla ricerca biomedica, un valido strumento di analisi cellulare in modalità High Throughput. Questo strumento è stato realizzato partendo da un prototipo di bioreattore cellulare, sviluppato, nel 2000, dal Centro Interdipartimentale di Ricerca E.Piaggio. Durante questo lavoro si è provveduto, quindi, all'ottimizzazione del suddetto bioreattore, al fine di trasformarlo, da prototipo in fase di test, a vero e proprio macchinario da laboratorio, capace di svolgere, in modo autonomo, esperimenti in modalità High Throughput.

Numerose sono state le modifiche apportate al prototipo di bioreattore, al fine di trasformarlo in prodotto commercializzabile, ma, fra tutte le modifiche, quella che ne ha maggiormente cambiato il funzionamento, è stata sicuramente la sostituzione della scheda di controllo.

Grazie al nuovo sistema di controllo, il bioreattore è stato trasformato in un vero e proprio apparato autonomo di analisi di tessuti cellulari, avente la capacità di decidere quale sia la miglior strategia per il mantenimento delle variabili ambientali.

Il nuovo sistema di controllo è stato realizzato mediante l'utilizzo di una libreria per la scrittura di software di controllo per robot, Robotics4.NET, sviluppata dal Dipartimento di Informatica dell'Università di Pisa.

Tutti i test effettuati sul nuovo sistema di testing cellulare hanno dimostrato come questo apparato sia in grado di mantenere correttamente in vita, tessuti cellulari per molti giorni, il tutto in modo automatico e senza la necessità di essere collegato ad un PC.

Questo sistema ha sicuramente in sé le potenzialità per poter rivoluzionare il settore del Tissue Engineering, in quanto dà la possibilità di eseguire esperimenti su colture cellulari in ambiente simulato, in modo automatico e con la possibilità di riprendere visivamente la coltura cellulare sotto microscopio, durante l'intera durata dell'esperimento, tutto questo senza la presenza diretta di un operatore.

Il nuovo apparato è, infatti, controllabile a distanza, mediante una semplice connessione di rete e permetterà, quindi, ai ricercatori, di poter osservare le colture cellulari e l'andamento dell'esperimento da remoto.

Un ulteriore punto di forza del nuovo sistema sviluppato durante questo lavoro di tesi, è sicuramente l'abbattimento dei costi di realizzazione dell'intero apparato. Grazie alle modifiche apportate, per l'installazione di quattro bioreattori all'interno di un laboratorio, si arriva ad un risparmio di circa 8500 €; si ottiene, inoltre, un notevole risparmio dal punto di vista degli spazi di lavoro necessari all'installazione.

Numerosi potranno essere gli sviluppi futuri di questo nuovo sistema di analisi cellulare, e questo lavoro di tesi è stato realizzato in modo da facilitare tutte le future migliorie del sistema.

Sono già in fase di studio sistemi di invio allarmi mediante SMS o Mail da integrare nel bioreattore e il sistema di riscaldamento, mediante bagnetto termostatico, verrà in seguito sostituito da un sistema di riscaldamento dedicato e direttamente collegabile al nuovo apparato di controllo.

Sarà, inoltre, necessario continuare a testare il sistema, al fine di individuare quali siano i parametri migliori per l'algoritmo di controllo del pH.

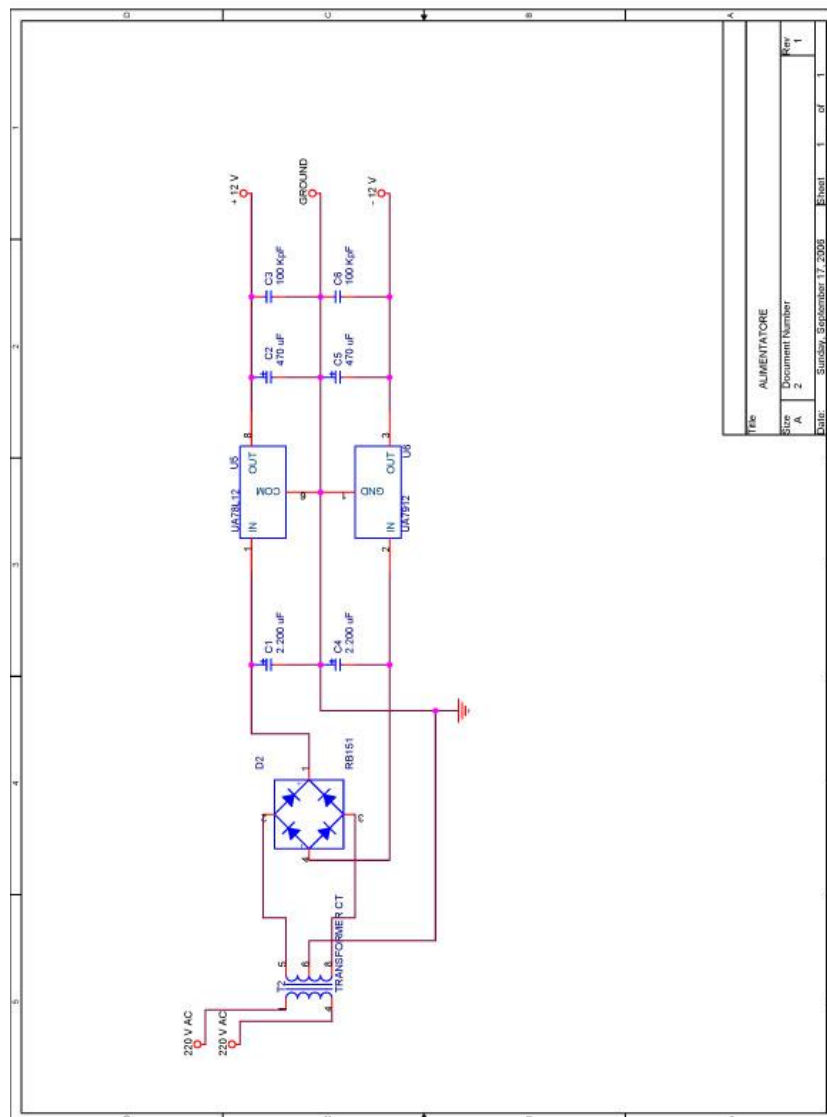
Infine è bene sottolineare come questo lavoro sia frutto della collaborazione fra il mondo dell'ingegneria e quello dell'informatica. Questi due diversi approcci della scienza spesso tendono ad osservare la realtà da due punti di vista troppo diversi, ma, ogni qualvolta riescano a trovare un punto di incontro, danno inevitabilmente alla luce soluzioni estremamente innovative, in quanto frutto della fusione di due tipi di conoscenza molto differenti, ma, allo stesso tempo, complementari.

Appendice A

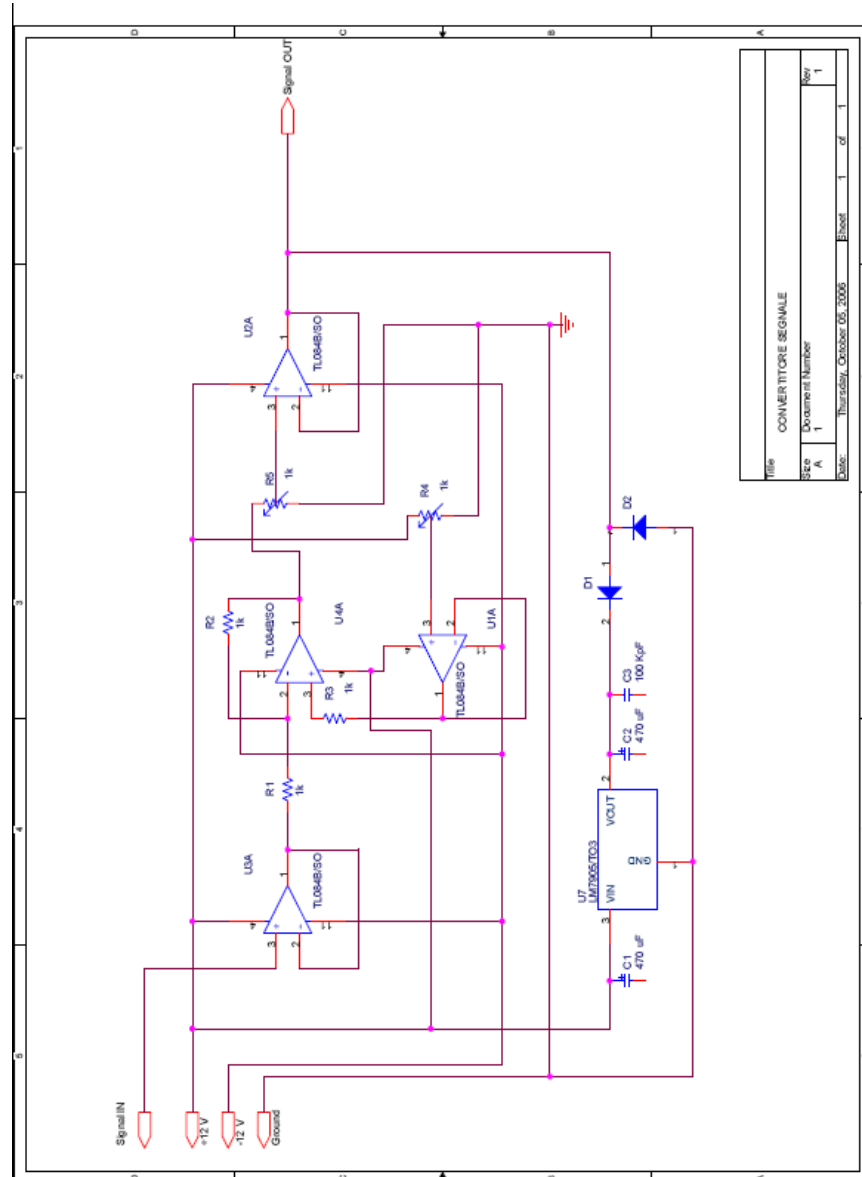
Schemi elettrici

In questo appendice sono riportati gli schemi elettrici dei circuiti realizzati durante questo lavoro di tesi.

7.6 Alimentatore duale ± 12 Volt



7.7 Circuito di conversione del segnale



Appendice B

Datasheet

In questo appendice verranno riportate le pagine iniziali dei datasheet relativi ai componenti utilizzati durante questo lavoro di tesi.

7.8 Scheda National Instruments PCI

NI 6034E/6035E/6036E Family Specifications

This document lists the I/O terminal summary and specifications for the devices that make up the NI 6034E/6035E/6036E family of devices. This family includes the following devices:

- NI PCI-6034E
- NI PCI-6035E
- NI DAQCard-6036E
- NI PCI-6036E

I/O Terminal Summary

Note With NI-DAQmx, National Instruments revised its terminal names so they are easier to understand and more consistent among NI hardware and software products. The revised terminal names used in this document are usually similar to the names they replace. For a complete list of Traditional NI-DAQ (Legacy) terminal names and their NI-DAQmx equivalents, refer to *Terminal Name Equivalents of the E Series Help*.

Table 1. I/O Terminals

Terminal Name	Terminal Type and Direction	Impedance Input/ Output	Protection (V) On/Off	Source (mA at V)	Sink (mA at V)	Rise Time (ns)	Bias
AI <0..15>	AI	100 G Ω in parallel with 100 pF	25/15	—	—	—	± 200 pA
AI SENSE	AI	100 G Ω in parallel with 100 pF	25/15	—	—	—	± 200 pA
AI GND	—	—	—	—	—	—	—
AO 0 [†]	AO	0.1 Ω	Short-circuit to ground	5 at 10	5 at -10	—	—
AO 1 [†]	AO	0.1 Ω	Short-circuit to ground	5 at 10	5 at -10	—	—
AO GND	—	—	—	—	—	—	—
D GND	—	—	—	—	—	—	—

7.9 Scheda National Instruments USB

Portable High-Performance Multifunction DAQ for USB

NI DAQPad-6015, NI DAQPad-6016

- 16 analog inputs at up to 200 kS/s, 16-bit resolution
- Multiple signal connectivity options
- 2 analog outputs for accurate output signals
- Up to 32 digital I/O lines (5 V TTL/CMOS)
- OEM version available

Operating Systems

- Windows 2000/XP

Recommended Software


- LabVIEW
- LabWindows/CVI
- Measurement Studio
- VI Logger

Other Compatible Software

- C++
- C#
- Visual Basic

Measurement Services Software (included)

- NI-DAQmx driver software
- Measurement & Automation Explorer configuration software



Product	Bus	Analog Inputs	Input Resolution	Sampling Rate	Input Range	Analog Outputs	Output Resolution	Output Rate*	Output Range	Digital I/O	Connectors	Inputs
NI DAQPad-6015	USB	16 SE/8 DI	16 bits	200 kS/s	±0.05 V to ±10 V	2	16 bits	300 S/s	±10 V	8	2	Digital
NI DAQPad-6016	USB	16 SE/8 DI	16 bits	200 kS/s	±0.05 V to ±10 V	2	16 bits	300 S/s	±10 V	32	2	Digital

*S1 - single-ended; D - differential; *System dependent

Hardware Overview

The National Instruments DAQPad-6015 and DAQPad-6016 multifunction data acquisition (DAQ) devices provide plug-and-play connectivity via USB for acquiring, generating, and logging data in a variety of portable and desktop applications. DAQPad devices with screw terminals or BNC connectors provide direct connectivity so you can easily connect sensors and signals without extra cost. With DAQPad-6015 mass termination, you can cable to external accessories and signal conditioning devices such as NI SCC devices. All devices feature 16-bit accuracy at up to 200 kS/s. The DAQPad-6016 also provides 32 digital I/O lines for applications requiring an extended interface to digital sensors and actuators.

Software Overview

NI DAQPad-6015 and DAQPad-6016 include NI-DAQmx measurement services software with which you can quickly configure and begin taking measurements with your DAQ device. NI-DAQmx provides a seamless interface to LabVIEW, LabWindows/CVI, and Measurement Studio development environments with features such as DAQ Assistant and a single programming interface for all device functions.

Recommended Accessories

Model	Cable		Signal Connectivity	
	Noise-Reducing Shielded	Low-Cost, Unshielded	Sensors/Signal > 10 V	Signal < 10 V
NI DAQPad-6015 Screw Terminal			Built-in signal connectivity - no accessories needed	
NI DAQPad-6015 Screw Terminal			Built-in signal connectivity - no accessories needed	
NI DAQPad-6015 BNC			Built-in signal connectivity - no accessories needed	
NI DAQPad-6015 Mass Termination	SMR-50-EP	SEB50	SCC signal conditioning	SCC-60
NI DAQPad-6016 OEM	SMR-50	SEB50	Custom or third-party OEM connector	
	SMR50	SEB50		CB-50LP

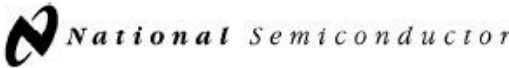
Table 2. NI DAQPad-6015 Accessory Selection Guide

Common Applications

- The DAQPad-6015 and DAQPad-6016 are ideal for a number of applications where portability and accurate measurements are essential, such as:
- Portable data logging - log environmental or voltage data quickly and easily
 - Field-monitoring applications
 - Embedded OEM applications
 - In-vehicle data acquisition
 - Academic lab use - academic discounts are available for quantities of five or more. Visit ni.com/academic for details.



7.10 Convertitore D/A DAC0808


January 1995

DAC0808/DAC0807/DAC0806 8-Bit D/A Converters

General Description

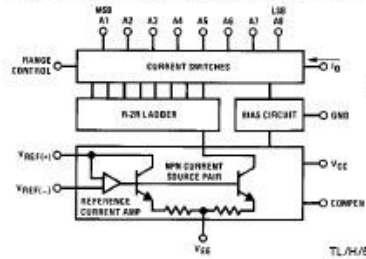
The DAC0808 series is an 8-bit monolithic digital-to-analog converter (DAC) featuring a full scale output current settling time of 150 ns while dissipating only 33 mW with $\pm 5V$ supplies. No reference current (I_{REF}) trimming is required for most applications since the full scale output current is typically ± 1 LSB of $255 I_{REF} / 256$. Relative accuracies of better than $\pm 0.19\%$ assure 8-bit monotonicity and linearity while zero level output current of less than $4 \mu A$ provides 8-bit zero accuracy for $I_{REF} \geq 2$ mA. The power supply currents of the DAC0808 series are independent of bit codes, and exhibits essentially constant device characteristics over the entire supply voltage range.

The DAC0808 will interface directly with popular TTL, DTL or CMOS logic levels, and is a direct replacement for the MC1508/MC1408. For higher speed applications, see DAC0800 data sheet.

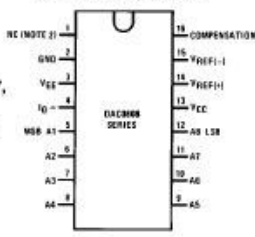
Features

- Relative accuracy: $\pm 0.19\%$ error maximum (DAC0808)
- Full scale current match: ± 1 LSB typ
- 7 and 6-bit accuracy available (DAC0807, DAC0806)
- Fast settling time: 150 ns typ
- Noninverting digital inputs are TTL and CMOS compatible
- High speed multiplying input slew rate: $8 \text{ mA}/\mu\text{s}$
- Power supply voltage range: $\pm 4.5V$ to $\pm 18V$
- Low power consumption: 33 mW @ $\pm 5V$

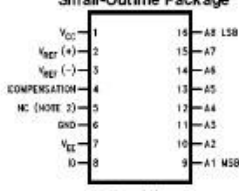
Block and Connection Diagrams



Order Number
 DAC0808, DAC0807,
 or DAC0806
 See NS Package
 Number J16A,
 M16A or N16A



TL/H/5687 - 2



TL/H/5687 - 13


Ordering Information

ACCURACY	OPERATING TEMPERATURE RANGE	ORDER NUMBERS				
		J PACKAGE (J16A)*		N PACKAGE (N16A)*		SO PACKAGE (M16A)
7-bit	$0^\circ\text{C} \leq T_A \leq +75^\circ\text{C}$	DAC0807LCJ	MC1408L7	DAC0808LCN	MC1408P8	DAC0808LCM
6-bit	$0^\circ\text{C} \leq T_A \leq +75^\circ\text{C}$	DAC0806LCJ	MC1408L6	DAC0807LCN	MC1408P7	DAC0807LCM
				DAC0806LCN	MC1408P6	DAC0806LCM

*Note: Devices may be ordered by using either order number.

DAC0808/DAC0807/DAC0806 8-Bit D/A Converters

7.11 Regolatori di tensione LM7805 - LM7812


July 2006

LM340/LM78XX Series 3-Terminal Positive Regulators

General Description

The LM140/LM340A/LM340/LM78XXC monolithic 3-terminal positive voltage regulators employ internal current-limiting, thermal shutdown and safe-area compensation, making them essentially indestructible. If adequate heat sinking is provided, they can deliver over 1.0A output current. They are intended as fixed voltage regulators in a wide range of applications including local (on-card) regulation for elimination of noise and distribution problems associated with single-point regulation. In addition to use as fixed voltage regulators, these devices can be used with external components to obtain adjustable output voltages and currents.

Considerable effort was expended to make the entire series of regulators easy to use and minimize the number of external components. It is not necessary to bypass the output, although this does improve transient response. Input bypassing is needed only if the regulator is located far from the filter capacitor of the power supply.

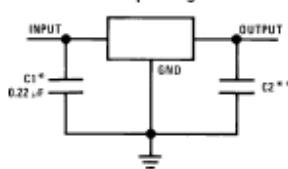
The 5V, 12V, and 15V regulator options are available in the steel TO-3 power package. The LM340A/LM340/LM78XXC series is available in the TO-220 plastic power package, and the LM340-5.0 is available in the SOT-223 package, as well as the LM340-5.0 and LM340-12 in the surface-mount TO-263 package.

Features

- Complete specifications at 1A load
- Output voltage tolerances of $\pm 2\%$ at $T_J = 25^\circ\text{C}$ and $\pm 4\%$ over the temperature range (LM340A)
- Line regulation of 0.01% of V_{OUT}/V of ΔV_{IN} at 1A load (LM340A)
- Load regulation of 0.3% of V_{OUT}/A (LM340A)
- Internal thermal overload protection
- Internal short-circuit current limit
- Output transistor safe area protection
- P* Product Enhancement tested

Typical Applications

Fixed Output Regulator

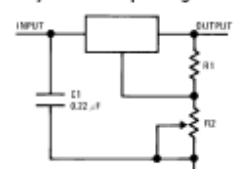


02779101

*Required if the regulator is located far from the power supply filter.

**Although no output capacitor is needed for stability, it does help transient response. (If needed, use 0.1 µF, ceramic disc).

Adjustable Output Regulator

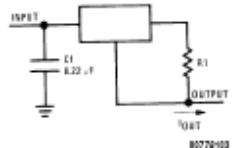


02779102

$V_{OUT} = 5V + (5V/R1 + I_Q) R2$ $5V/R1 > 3 I_Q$

load regulation (L_L) = $[(R1 + R2)/R1] (L_L \text{ of LM340-5})$

Current Regulator

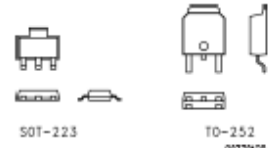


00779103

$$I_{OUT} = \frac{V_{2.3}}{R1} + I_Q$$

$\Delta I_Q = 1.3 \text{ mA}$ over line and load changes.


Comparison between SOT-223 and D-Pak (TO-252) Packages



Scale 1:1

LM340/LM78XX Series 3-Terminal Positive Regulators

7.12 Regolatore di tensione LM7912



National Semiconductor

September 2001

LM79MXX Series 3-Terminal Negative Regulators

LM79MXX Series 3-Terminal Negative Regulators

General Description

The LM79MXX series of 3-terminal regulators is available with fixed output voltages of -5V, -12V, and -15V. These devices need only one external component—a compensation capacitor at the output. The LM79MXX series is packaged in the TO-220 power package, and is capable of supplying 0.5A of output current.

These regulators employ internal current limiting, safe area protection, and thermal shutdown for protection against virtually all overload conditions.

Low ground pin current of the LM79MXX series allows output voltage to be easily boosted above the preset value with

a resistor divider. The low quiescent current of these devices with a specified maximum change with line and load ensures good regulation in the voltage boosted mode.

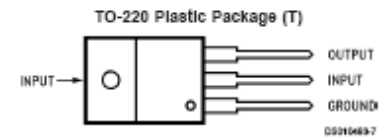
For output voltage other than -5V, -12V, and -15V the LM137 series provides an output voltage range from -1.2V to -57V.

Features

- Thermal, short circuit and safe area protection
- High ripple rejection
- 0.5A output current
- 4% tolerance on preset output voltage

Connection Diagram

TO-220 Plastic Package (T)



Front View

Order Number LM79M05CT, LM79M12CT or LM79M15CT
See NS Package Number T03B

© 2001 National Semiconductor Corporation DS010483

www.national.com

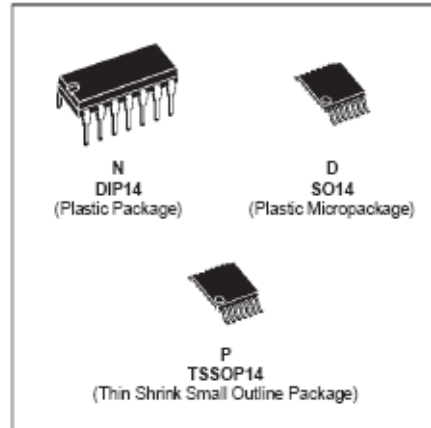
7.13 Amplificatore operazionale TL084



TL084 TL084A - TL084B

GENERAL PURPOSE J-FET QUAD OPERATIONAL AMPLIFIERS

- WIDE COMMON-MODE (UP TO V_{CC}^+) AND DIFFERENTIAL VOLTAGE RANGE
- LOW INPUT BIAS AND OFFSET CURRENT
- OUTPUT SHORT-CIRCUIT PROTECTION
- HIGH INPUT IMPEDANCE J-FET INPUT STAGE
- INTERNAL FREQUENCY COMPENSATION
- LATCH UP FREE OPERATION
- HIGH SLEW RATE : 16V/ μ s (typ)



DESCRIPTION

The TL084, TL084A and TL084B are high speed J-FET input quad operational amplifiers incorporating well matched, high voltage J-FET and bipolar transistors in a monolithic integrated circuit.

The devices feature high slew rates, low input bias and offset currents, and low offset voltage temperature coefficient.

ORDER CODES

Part Number	Temperature Range	Package		
		N	D	P
TL084M/AM/BM	-55°C, +125°C	•	•	•
TL084I/AI/BI	-40°C, +105°C	•	•	•
TL084C/AC/BC	0°C, +70°C	•	•	•

Examples : TL084CN, TL084CD

PIN CONNECTIONS (top view)

