



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI TRENTO

Dipartimento di Ingegneria e Scienza dell'Informazione

Corso di Laurea in  
Informatica

ELABORATO FINALE

TITOLO

*Sottotitolo (alcune volte lungo - opzionale)*

Supervisore  
Martin Michael Hanczyc

Laureando  
Carlotta Porcelli

Anno accademico 2015/2016

# Ringraziamenti

*qualcosa*

# Indice

<b>Sommario</b>	<b>2</b>
<b>1 Introduzione</b>	<b>3</b>
1.1 La Biologia Sintetica . . . . .	3
1.2 Il progetto EVOBLISS . . . . .	4
1.2.1 EVOBLISS a Trento . . . . .	4
<b>2 La piattaforma robot</b>	<b>5</b>
2.1 La componente hardware . . . . .	5
2.1.1 La testa . . . . .	7
2.1.2 Le siringhe . . . . .	7
2.2 La componente software . . . . .	8
2.2.1 Il controllo manuale . . . . .	8
2.2.2 La calibrazione . . . . .	8
2.2.3 L'identificazione delle droplet . . . . .	8
<b>3 Il sistema chimico</b>	<b>9</b>
3.1 Chemiotassi e Chemiochinesi . . . . .	9
3.1.1 L'importanza del movimento . . . . .	10
3.2 Componenti inorganiche . . . . .	10
<b>4 Raccolta dati ed analisi</b>	<b>12</b>
4.1 Esperimento con software . . . . .	12
4.1.1 Preparazione . . . . .	12
4.1.2 Raccolta dati . . . . .	13
4.1.3 Elaborazione dati . . . . .	13
4.2 Risultati . . . . .	14
4.2.1 20mM . . . . .	14
4.2.2 10mM . . . . .	15
4.2.3 5mM . . . . .	16
4.2.4 Considerazioni generali . . . . .	17
<b>5 Conclusioni e Sviluppi Futuri</b>	<b>18</b>
5.1 Argomentazione dei risultati . . . . .	18
5.2 Problemi nella struttura del robot . . . . .	18
5.2.1 La testa ed il modulo siringa . . . . .	18
5.3 Conduzione degli esperimenti . . . . .	19
5.3.1 Influenza di agenti esterni . . . . .	19
5.3.2 Modifiche nel protocollo e automazione . . . . .	19
5.3.3 Conslusioni generali . . . . .	19
<b>Bibliografia</b>	<b>19</b>

# Sommario

Sommario è un breve riassunto del lavoro svolto dove si descrive l'obiettivo, l'oggetto della tesi, le metodologie e le tecniche usate, i dati elaborati e la spiegazione delle conclusioni alle quali siete arrivati.

Il sommario dell'elaborato consiste al massimo di 3 pagine e deve contenere le seguenti informazioni:

- contesto e motivazioni
- breve riassunto del problema affrontato
- tecniche utilizzate e/o sviluppate
- risultati raggiunti, sottolineando il contributo personale del laureando/a

# 1 Introduzione

“Why is it less acceptable to seek how to make a cell than how to make a molecule?”

— Stéphane Leduc

“Come è iniziata la vita?": la domanda più interessante che l'umanità si sia mai posta. La necessità di trovare una spiegazione al fenomeno dell'origine della vita ha portato il mondo della ricerca a soffermarsi sulla possibile riproducibilità in laboratorio di aspetti semplici degli organismi viventi. Nel 1911 Stéphane Leduc, biologo francese, scrisse: «[...] la sintesi della vita deve avvenire nella produzione di forme intermedie tra il mondo organico ed il mondo inorganico, forme che possiedono soltanto alcuni rudimentali attributi di vita, alle quali altri attributi verranno aggiunti nel corso dello sviluppo dall'azione dell'ambiente circostante». Questa unione di elementi provenienti dal mondo vivente e dal mondo “non vivente” ci permette di iniziare la costruzione di strutture semplici per poi svilupparle in forme sempre più simili ad “esseri viventi”. Lo studio affrontato in questo progetto si avvale delle tecniche della biologia sintetica per tentare di riprodurre comportamenti molto semplici, il movimento nel nostro caso.

## 1.1 La Biologia Sintetica

Nel 1912 appare per la prima volta il termine “biologia sintetica” coniato dal biologo francese Stéphane Leduc (1853-1939) nel libro “La Biologie Syntetique”. Egli affermò: «Quando avremo modo di conoscere il meccanismo fisico della produzione di un oggetto o di un fenomeno,[...] diventa possibile[...] riprodurre l'oggetto o il fenomeno, in quel momento la scienza diventa sintetica. La biologia è una scienza come le altre, [...] deve essere in successione: descrittiva, analitica e sintetica». Lo scopo del nostro progetto è quello di riprodurre caratteristiche base degli organismi viventi, nello specifico ci si è soffermati sul movimento in un sistema chimico.

Il termine viene successivamente ripreso nel 1974 dal genetista polacco Waclaw Szybalski: «Discutiamo ora del seguente problema, ovvero cosa avverrà dopo? Fino ad ora abbiamo lavorato sulla fase descrittiva della biologia molecolare. Ma la vera sfida partirà quando entreremo nella fase della sintesi biologica[...]. Io non credo che esauriremo idee nuove ed eccitanti[...] nella biologia sintetica.» [11]

Al fine di “sintetizzare” un essere vivente, le caratteristiche da ricercare sono:

- un corpo: per distinguere il soggetto dall'ambiente circostante
- un metabolismo: processo per il quale il soggetto prende risorse dall'ambiente e le trasforma in sostanze di mantenimento
- informazione ereditabile: contenuta nel genoma ed in grado di essere passata alle generazioni successive

L'unione dei primi due punti ci porta ad avere un organismo in grado di muoversi e replicarsi, se in seguito aggiungessimo la capacità di passare l'informazione genomica avremmo così realizzato un soggetto evolutivo. La Biologia Sintetica prevede due approcci diversi, nel primo caso si cerca di ricreare una nuova funzione e applicazione riprogrammando organismi già esistenti. Il secondo approccio prevede la sintesi da zero di forme di vita artificiale con alcune funzionalità degli esseri viventi aggiungendo singoli componenti al sistema. Il progetto si è focalizzato su questo approccio. Varie sostanze chimiche vengono utilizzate e riorganizzate in strutture e reti che si comportano come sistemi viventi. I sistemi vengono alimentati con opportuni nutrienti e viene osservato il loro comportamento, nello specifico il movimento, altra caratteristica fondamentale di un organismo vivente.

## 1.2 Il progetto EVOBLISS

Il progetto EVOBLISS è un progetto di ricerca europeo finanziato dalla Commissione Europea FET (Future and Emerging Technologies). A questo progetto partecipano i laboratori di cinque diverse università europee:

- IT University of Copenhagen (ITU) – Denmark
- University of West of England (UWE) – Bristol, Great Britain
- Karlsruhe Institute of Technology (KIT) – Germany
- University of Glasgow (UGL) – Great Britain
- Università degli Studi di Trento – Italy

Il progetto mira a sviluppare un tipo di evoluzione artificiale e tecnologica da utilizzare per la progettazione di sistemi funzionali composti da tre forme di *living technology*: vita chimica artificiale, microrganismi viventi e da reti di reazioni chimiche complesse usate per migliorare il processamento e la purificazione di acque di scarico per la generazione di energia. Il progetto EVOBLISS combina gli approcci scientifici della robotica, dell'intelligenza artificiale, della chimica e della microbiologia per sfruttare al meglio le avanguardie di queste discipline. Lo scopo finale è quello di produrre una piattaforma robotica facilmente utilizzabile e personalizzabile per l'evoluzione artificiale di nuovi materiali e per l'ottimizzazione delle performance di sistemi psicochimici e microbici. Il prodotto su cui si è lavorato è EvoBot, un robot in grado di gestire liquidi e di fornire riscontri in tempo reale, sui sistemi da esso stesso creati.

### 1.2.1 EVOBLISS a Trento

Il laboratorio di Biologia Artificiale del CIBIO - Centre for Integrative Biology dell'Università di Trento è parte integrante del progetto EVOBLISS. Qui ci si occupa di sviluppare diversi tipi di cellule artificiali basandosi su emulsioni *droplet-based*. Le *droplet* a cui si fa riferimento sono composte da *1-Decanolo* ( $C_{10}H_{21}OH$ ). Il decanolo è formato da una catena lineare di alcol grasso con 10 atomi di carbonio.[1] Essendo incolore vi si aggiunge *Oil Red O* [2], un colorante solubile con i grassi che lo rende visibile all'occhio umano e ci permette di tenerne traccia all'interno del sistema. Le *droplet* analizzate hanno volume pari a  $30\mu l$ , il volume è stato scelto per avere una migliore tracciabilità dal programma di analisi di *computer vision*. Le caratteristiche prese in analisi sono simili a quelle che possono caratterizzare un essere vivente: l'auto-movimento, l'auto-divisione, la trasformazione biochimica e le dinamiche di gruppo.

La piattaforma è stata qui adattata alla necessità di monitorare il movimento delle *droplet* a partire dal momento in cui queste escono da un sistema di equilibrio, studiando l'ottimizzazione dei parametri che definiscono l'ambiente in cui queste si muovono. Lo scopo ultimo è quello di incrementare la conoscenza delle *living technologies* e di ideare e sfruttare al meglio sistemi bio-ibridi innovativi. Ulteriori studi hanno visto l'implementazione di programmi per il riconoscimento di *droplet* multiple.

## 2 La piattaforma robot

EvoBot è un robot che unisce elementi delle stampanti 3D con quelli della robotica modulare per fornire a chimici, microbiologi e ricercatori nel campo della vita (a livello chimico) artificiale, uno strumento economico ed estendibile basato su una piattaforma open source di robotica per il trattamento di liquidi. La particolarità di EvoBot sta nell'interazione continua ed in tempo reale dell'utente con l'esperimento in corso.[5] Inoltre utilizzare un robot per la gestione degli esperimenti ci ha permesso di diminuire, quasi annullare, l'incertezza e la variazione tra gli esperimenti causata dalla mano umana. Come le comuni stampanti 3D, questo robot è composto da una componente hardware guidata da una parte software.

### 2.1 La componente hardware

EvoBot è composto, a livello elettronico, da un Arduino Mega 2560 su cui è montata una scheda RAMPS (RepRap Arduino Mega Pololu Shield); queste due schede controllano la testa del robot, i moduli ad essa collegati e gli input provenienti da sensori esterni. A livello meccanico, invece, è strutturato in tre strati: *actuation layer*, *experimental layer* e *observation layer*.

Partendo dal basso si trova lo strato dell'osservazione: *observation layer*. Questo *layer* non prevede nessuna interazione con gli esperimenti in corso sul layer superiore. E' utilizzato per il posizionamento di moduli che andranno a raccogliere dati, senza manipolare direttamente l'esperimento, che verranno forniti sia al robot sia all'utente. Nel nostro caso è presente una webcam.

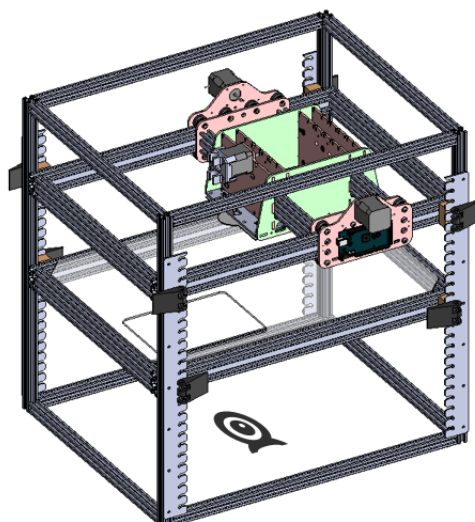


Figura 2.1: La struttura completa con l'observational layer

Il secondo strato è quello degli esperimenti: *experimental layer*. Questo strato è essenzialmente composto da una cornice in alluminio, identica a quella della struttura esterna del robot, che racchiude una piastra di vetro. Su questo strato possono essere posti i recipienti richiesti dagli specifici esperimenti. Una fessura rettangolare ad uno degli angoli permette le manovre di sostituzione dei recipienti in uso. La sua funzionalità verrà sfruttata in futuro creando un distributore automatico di *Petri dish* da posizionarvi all'interno.

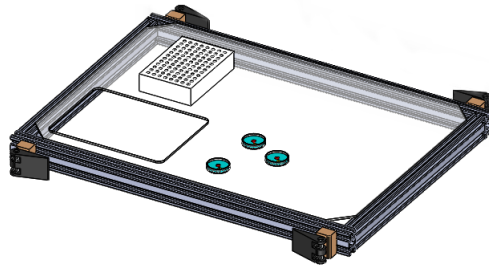


Figura 2.2: experimental layer

L'ultimo dei tre strati è lo strato di attivazione, *actuation layer*, ovvero la testa del robot. Questo layer si occupa del movimento della testa sul piano orizzontale per mezzo di un meccanismo cinghia-ruota dentata con due motori *stepper*. La testa si può muovere nelle due direzioni sul livello orizzontale:  $x$  e  $z$ .

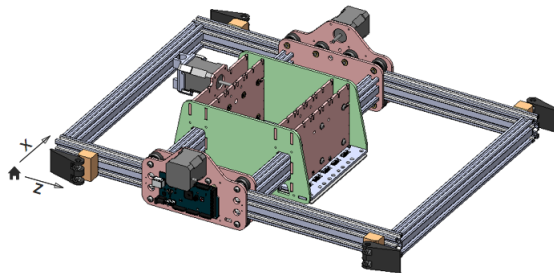


Figura 2.3: actuation layer



### 2.1.1 La testa

La *head*, testa del robot, è la componente principale dell'*actuation layer*. E' composta di 17 *socket* all'interno delle quali possono essere inseriti diversi moduli. Tuttavia, per come è stata strutturata, non c'è possibilità di inserire tutti i moduli contemporaneamente. Essa può contenere fino ad un massimo di 11 moduli per fornire funzionalità differenti. Ad oggi esiste soltanto il modulo siringa ma si prevede nel breve futuro, la costruzione di altri moduli come sensori di pH e di temperatura.

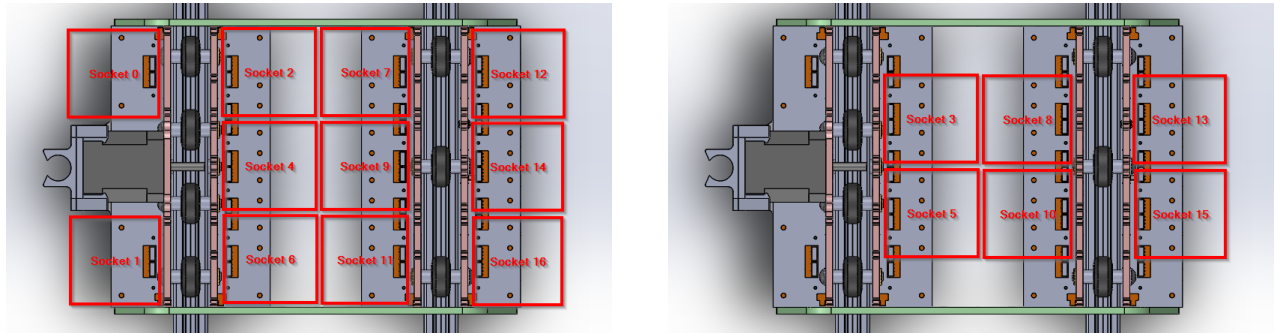


Figura 2.4: socket disposition

### 2.1.2 Le siringhe

Il modulo siringa ha due gradi di movimento verticale. Ogni modulo è composto di un motore passo-passo lineare per il movimento dello stantuffo, *plunger*, e di un meccanismo a rochetto e cremagliera con un secondo motore passo-passo per il movimento del corpo della siringa. La siringa può essere facilmente sostituita dando all'utente l'opportunità di utilizzare siringhe con specifiche differenti in base alle necessità dell'esperimento. Le siringhe sono la componente di EvoBot che gli consente di gestire sostanze liquide.

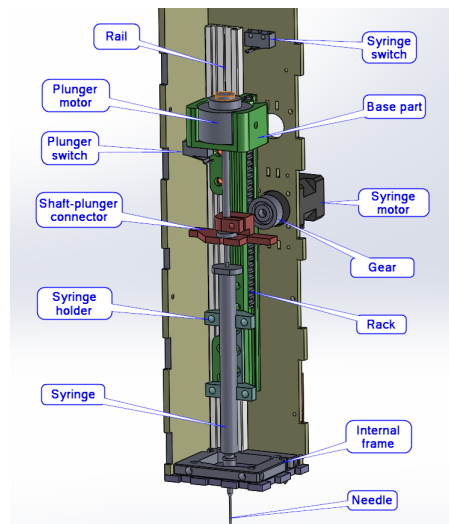


Figura 2.5: syringe module

## 2.2 La componente software

La finalità della componente software è quella di fornire all'utente finale un'interfaccia facilmente programmabile per guidare il robot. Il software è suddiviso in una *host side* e in una *robot side*. La prima comunica con la seconda attraverso una connessione USB. La *robot side* è una versione modificata del firmware Marlin usato nei programmi opensource delle stampanti 3D.

Il linguaggio di programmazione utilizzato per la stesura delle API e dei programmi successivi è Python. La suite software offerta al momento dell'installazione è composta da tre elementi: un programma di *computer vision* per la calibrazione del robot, un'interfaccia grafica per il controllo manuale del robot ed un esempio di programma, sviluppato utilizzando le API, per l'identificazione delle componenti di uno specifico esperimento.

L'obiettivo dello sviluppo della componente software è stato quello di creare un programma in grado di controllare il robot manualmente in tempo reale e raccogliere i dati necessari dagli esperimenti eseguiti, di cui si parlerà nel prossimo capitolo.

### 2.2.1 Il controllo manuale

La scelta di un software per il controllo manuale del robot nasce dalla necessità di ottenere la posizione di oggetti di interesse (Petri dishes e recipienti vari) sullo strato degli esperimenti. L'interfaccia grafica permette di testare le diverse funzioni del robot senza il bisogno di ricorrere alla programmazione. Per esempio, si può muovere la testa del robot fino a centrare uno dei contenitori, far scendere la siringa all'interno di questo e registrare la posizione del centroide dell'oggetto.

Per controllare manualmente EvoBot si utilizza Printron [4], una *3D printing host suite* opensource, con la quale, attraverso dei codici G standard, si controlla il movimento della testa del robot e con dei codici M speciali si controlla il movimento delle siringhe e degli stantuffi. Inoltre con i codici M si possono identificare i limiti dei due movimenti che una siringa può compiere.

### 2.2.2 La calibrazione

La calibrazione è il primo passo importante per correlare il sistema di coordinate della videocamera con quello del robot. A questo scopo viene creata la matrice di trasformazione compiendo le istruzioni imposte dal programma `calibrationExample.py`. Avendo la possibilità di posizionare le differenti piastre di Petri su tutto lo strato degli esperimenti o di impostare la distanza tra *l'actuation layer* e *experimental layer*, il programma è pensato per specificare i punti esatti per una massima accuratezza nella calibrazione. All'interno del programma si definisce il punto in cui è posizionata la Petri *dish*, il suo diametro e la distanza tra i due layer. Avvenuta la calibrazione, si hanno a disposizione le matrici di ogni siringa da poter utilizzare nei programmi successivi per muovere le siringhe nei punti richiesti dagli esperimenti.

### 2.2.3 L'identificazione delle droplet

Una delle finalità prioritarie del progetto è l'identificazione di gocce, *droplet*, per trovare l'area, il colore, il numero, la forma e, più importante, per tracciarne il movimento.

La componente principale utilizzata per l'identificazione è la libreria OpenCV (Open Source Computer Vision Library)[3] che include diverse funzioni ed algoritmi di *computer vision*.

## 3 Il sistema chimico

Una delle proprietà fondamentali degli organismi viventi è l'abilità di sentire e rispondere ai cambiamenti dell'ambiente tramite il movimento. Se consideriamo la cellula, in termini generali, come un sistema chimico aperto in una situazione di non-equilibrio, è essenziale avere a disposizione un rifornimento di materiale fresco e di energia per sostenerla. Per fare in modo che questo avvenga, la cellula modifica il suo ambiente esterno metabolizzando risorse di sostentamento e producendo dei prodotti e degli scarti. Per evitare una situazione statica, di equilibrio, il sistema deve trovare in qualche modo nuove risorse ed evitare possibili effetti inibitori dei prodotti di scarto. In questo senso puramente chimico-biologico si crede che l'abilità di movimento giochi un ruolo importante per evitare lo stato di equilibrio nella creazione di sistemi cellulari artificiali. [8]

### 3.1 Chemiotassi e Chemiochinesi

Le cellule sono in grado di avvertire molecole solubili presenti nell'ambiente esterno ad esse e di percepirne eventuali cambiamenti; sono ad esempio capaci di percepire la formazione di gradienti di concentrazione. Una cellula che percepisce delle molecole solubili può muoversi lungo il gradiente di concentrazione creato da queste fino a raggiungere la sorgente oppure allontanarsi da questa nel caso in cui le sostanze rilasciate siano repellenti o tossine. In generale, la motilità di una cellula può essere di tre tipi:

1. motilità basale casuale: avviene in assenza di stimoli chimici,
2. Chemiochinesi: corrisponde ad un movimento casuale crescente, in risposta a stimoli chimici,
3. Chemiotassi: migrazione stimolata direzionale verso un gradiente chimico.

La *chemiotassi* può essere di tipo positivo in caso di avvicinamento alla sorgente e di tipo negativo in caso di allontanamento.

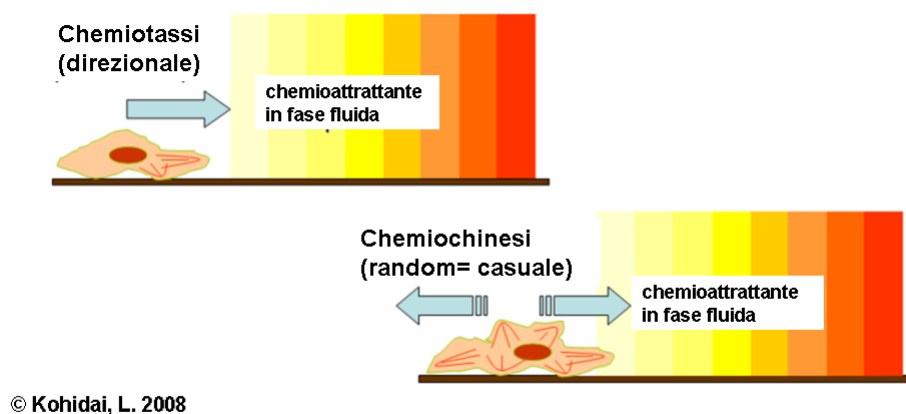


Figura 3.1: chemiotassi e chemiochinesi

E' stato qui considerato il movimento chemiotattico positivo promosso da una *droplet* di decanolo in acido decanoico lungo il gradiente di concentrazione creato dall'aggiunta di Cloruro di sodio.

### 3.1.1 L'importanza del movimento

Per gli organismi multicellulari la chemiotassi è importante nei processi fisiologici, come il reclutamento di cellule del sistema immunitario nei siti dell'infezione e negli organi dello sviluppo durante l'embriogenesi.[6] Le cellule neuronali e quelle embrionali, invece, migrano durante lo sviluppo. Durante l'angiogenesi, le cellule endoteliali vanno incontro a chemiotassi per formare i vasi sanguigni, mentre le cellule epiteliali e i fibroblasti si muovono con chemiotassi durante la guarigione di una ferita.[7] Tuttavia, oltre al ruolo in processi ovviamente benefici, la chemiotassi è coinvolta anche in tutti gli stadi cruciali del tumore cellulare, dalla disseminazione alla progressione delle metastasi. Molte cellule cancerogene, nello specifico quelle del tumore al seno, sono note per avere la preferenza nel metastatizzarsi in specifici organi e tessuti. Questa preferenza è correlata alla produzione di chemioattraenti del tessuto e degli organi bersaglio e ad una sovrapproduzione dei recettori di queste sostanze sulla superficie delle cellule cancerose [10]. Il movimento spontaneo di *droplet* liquide, particelle solide e gel in condizioni di non-equilibrio, è stato spesso studiato sia a livello teorico che sperimentale. Il movimento di auto-avanzamento di oggetti non biologici può simulare il comportamento chemiotattico o chemiocinetico di cellule viventi. Come nel caso di organelli mobili e cellule che esibiscono polarità, è necessaria una rottura spontanea della simmetria per scatenare l'auto-movimento di oggetti non biologici.

Una *droplet* posizionata sulla superficie di un substrato, può muoversi quando la superficie sottostante cambia il proprio motivo in modo asimmetrico creando una differenza nella tensione interfacciale tra il margine anteriore e il margine posteriore della *droplet*. Inoltre una *droplet* può rompere la simmetria attraverso una reazione chimica accoppiata che avviene all'interfaccia tra la *droplet* e la soluzione circostante. La reazione chimica produce una rottura della simmetria dovuta all'accumulo e al rilascio di prodotti che inducono la *droplet* a muoversi attraverso la soluzione acquosa.[9]

Il motivo del percorso della *droplet* osservato in questo studio è di tipo rettilineo ed è stato analizzato con un software di analisi visuale.

## 3.2 Componenti inorganiche

Questo studio ha esaminato in particolare la dinamica di una *droplet* di decanolo che si muove chemiotatticamente in una soluzione acquosa di Acido decanoico ( $CH_3(CH_2)_8COOH$ ) lungo i gradienti di concentrazione formati con l'aggiunta di Cloruro di sodio ( $NaCl$ ).[12]

E' stata analizzata la dipendenza parametrica della risposta chemiotattica della *droplet* al variare della concentrazione e del pH di Sodio decanoato in rapporto alla forza del gradiente di concentrazione di  $NaCl$ . Lo spazio multiparametrico utilizzato ha previsto l'esecuzione di due ripetizioni di ognuno dei nove esperimenti così composte:

Tabella 3.1: Spazio multiparametrico degli esperimenti

molarità \ ph	11	12	13
20mM			
10mM			
5mM			

Le soluzioni di acido decanoico in fase acquosa sono state preparate sciogliendo 3,44gr di Acido decanoico in 1L di acqua per avere una soluzione 20mM. Con l'aggiunta di 10mL di  $NaOH$  si è ottenuta una soluzione con pH13. Da questa si sono creati gli *stock*, a pH13, da 100mL ciascuno per le soluzioni nelle differenti molarità: 5mM diluendo 1/4 del volume con acqua, 10mM diluendone 1/2 e 20mM tenendo la soluzione non diluita.

Ulteriori 300mL della soluzione di partenza sono stati utilizzati per le soluzioni a pH12, il livello

desiderato di pH è stato raggiunto con l'aggiunta di  $10\mu L$  di  $HCl$ . Anche di questi si sono create le diluizioni con molarità  $5mM$ ,  $10mM$  e  $20mM$ .

I restanti  $300mL$  sono stati utilizzati per le soluzioni a  $pH11$  con ulteriore aggiunta di  $20\mu L$  di  $HCl$ ; applicando le stesse diluizioni per le stesse molarità. La soluzione di  $NaCl$  utilizzata è stata ottenuta disciogliendo  $10,227gr$  di  $NaCl$  in acqua per avere la molarità a  $3,5M$ .

Per rendere le droplet di decanolo visibili al software di analisi, si è aggiunto il colorante Oil Red O a  $20mL$  di decanolo in piccola quantità, fino al completo scioglimento.

## 4 Raccolta dati ed analisi

Analizzando i diversi comportamenti della droplet nei vari esperimenti eseguiti e tenendo in considerazione che l'obiettivo di tale studio è quello di fare in modo che questa si muova velocemente e in maniera precisa lungo un percorso ipotizzato, si è cercata la combinazione “migliore” dei parametri sperimentali che permettesse alla droplet di avvicinarsi il più possibile e nel minor tempo al punto in cui il sale è stato posto. Lo studio di questo movimento di chemiotassi, ci aiuterà a comprendere e a riprodurre le dinamiche di movimento delle cellule viventi.

### 4.1 Esperimento con software

L'esperimento precedentemente descritto, è stato eseguito per mezzo del programma appositamente sviluppato, utilizzando le API di EvoBot e sfruttando funzioni avanzate della libreria OpenCV. Per portare a termine l'intero esperimento, occorre completare tre fasi: preparazione, raccolta dati, elaborazione dati.

#### 4.1.1 Preparazione

Per permettere al robot di accedere a liquidi e risorse esterne, bisogna posizionare sul piano degli esperimenti tutto ciò di cui si potrebbe avere bisogno. Seguendo lo schema in figura, si posiziona (A) il decanolo, (B) il sale e (C) la Petri dish contenente uno strato di Decanoato.

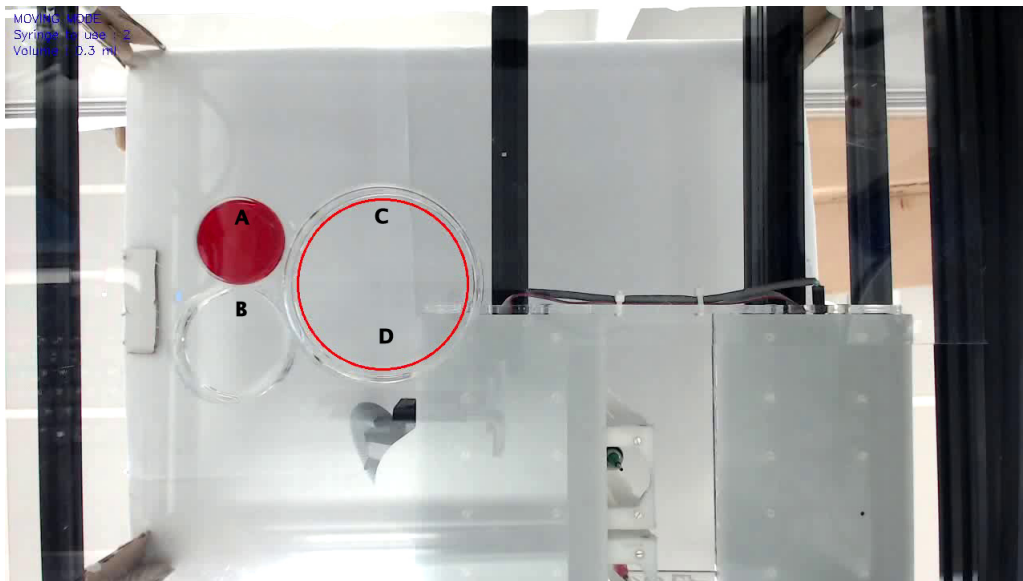


Figura 4.1: experimental layout

Il protocollo seguito prevede cinque passaggi fondamentali:

1. Limitare l'area di interesse.

La necessità di utilizzare Petri dish di diametri differenti e i problemi che possono essere causati da molteplici agenti esterni hanno suggerito che limitare la zona di interesse per ogni singolo esperimento potesse essere una soluzione: attraverso l'apposita interfaccia è possibile, quindi, disegnare un cerchio attorno alla Petri dish. Tutto ciò che si trova all'esterno di questo limite virtuale non verrà considerato dal programma.

2. Prelevare  $50\mu L$  di decanolo.

Utilizzando una siringa delle due a disposizione, si raggiunge il pozzetto A e si fa scendere il corpo della siringa per prelevare la quantità di decanolo richiesta. Bisogna tenere in considerazione che l'unità di volume che si può gestire è di  $10\mu L$ , grandezza nata dal compromesso tra avere un'interfaccia utilizzabile e una precisione accettabile.

3. Rilasciare  $30\mu L$  di decanolo.

Posizionando la siringa precedentemente caricata sopra la Petri dish in posizione C, si rilascia il decanolo. La scelta di prelevare una quantità maggiore di quella richiesta ci assicura l'immissione nel sistema della corretta quantità in quanto può accadere che un volume non definito venga trattenuto nel corpo o nella punta della siringa.

4. Prelevare  $500\mu L$  di NaCl.

Utilizzando l'altra siringa, si raggiunge il pozzetto B e si eseguono le stesse azioni del punto 2, prelevando questa volta il sale.

5. Immettere  $200\mu L$  di NaCl.

Posizionando la siringa attualmente in uso sopra la Petri dish in posizione D, si rilascia il sale.

#### 4.1.2 Raccolta dati

Fino ad ora l'utilizzo di EvoBot potrebbe risultare superfluo, è in questa fase che si può percepire il valore aggiunto che una macchina riesce ad apportare. Tramite l'utilizzo della webcam statica e la libreria di OpenCV, il programma permette di tracciare passo-passo i movimenti della droplet, fino a 30 movimenti al secondo. Avere a disposizione i singoli punti dell'intero tracciato, permette di registrare qualsiasi particolare caratteristica che sarebbe sfuggita all'occhio umano. L'utilizzo che si può fare di questi punti è limitato solo dalla fantasia, si possono calcolare accelerazioni, *pattern* oppure si possono comparare più percorsi dello stesso esperimento.

Nel nostro caso ci siamo limitati ad osservare se ci fosse un movimento della droplet verso il sale e si è cercato di capire in che ambiente questo risultasse più veloce e più preciso.

Per permettere alla webcam di riconoscere la droplet, questa è stata colorata di rosso grazie all'aggiunta del colorante Oil Red O alla soluzione di decanolo. Tuttavia, le droplet possono essere colorate non solo di rosso ma anche di altri colori, a seconda delle esigenze. Il programma mette a disposizione alcuni dei colori più utilizzati (come il rosso, il verde e il blu).

Per estrapolare informazioni dai dati raccolti durante l'esperimento, il programma si serve del salvataggio di essi su di un file *.csv*. Un esempio di questo file è disponibile nella tabella sottostante.

X salt	Y salt	X droplet Start	Y droplet Start	X droplet End	Y droplet End	time(s)
405	418	378	300	425	434	88

#### 4.1.3 Elaborazione dati

I file prodotti durante la raccolta dati, vengono successivamente presi in carico da un altro programma che ha il compito di analizzare queste rilevazioni col fine di generare un unico file contenente dati e metadati dei singoli esperimenti.

La colonna più importante del file generato è quella che prende il nome di "k". Questo coefficiente indica la precisione con cui la droplet si avvicina al sale ed è definita come:

$$k := \frac{d(C, B)}{d(A, C)} \quad (4.1)$$

Dove A rappresenta il punto in cui la droplet viene trovata all'inizio del tracking, B quello in cui viene posizionato il sale, C dove la droplet si trova ad esperimento concluso,  $d$  calcola la distanza euclidea tra i punti in questione.

Possiamo assumere che più  $d(C, B)$  tende a zero, più l'esperimento è preciso; da questo si evince che avere un  $k$  tendente a zero è indice di successo. Una volta ottenuti tutti i  $k$ , mantenendo costante il  $pH$  e le molarità, si vanno a calcolare tutti i  $k$  medio per ogni singolo ambiente. L'ambiente rappresentato dal minor  $k$  medio è quello che permette alla droplet di raggiungere il sale in maniera precisa e veloce.

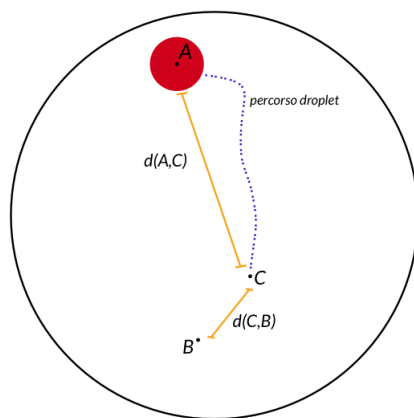


Figura 4.2: schema di un esperimento e degli elementi analizzati

Durante la raccolta dati si è deciso di salvare anche il tempo impiegato dalla droplet nel movimento ma questo dato non viene utilizzato in questo studio e potrà essere analizzato in studi futuri.

## 4.2 Risultati

La soluzione di acido decanoico presente nella Petri prima dell'inizio dell'esperimento si presenta sottoforma di ione decanoato con carica negativa. Per disciogliere 20mM di acido decanoico in 1L di acqua abbiamo bisogno di aumentare il pH, tramite una soluzione di idrossido di sodio (NaOH), altrimenti l'acido resterebbe in forma solida. I risultati sono stati suddivisi per classi di molarità per rendere più semplice la lettura dei dati.

### 4.2.1 20mM

Nelle figure seguenti si osservano le droplet nelle tre condizioni differenti di pH. Nella soluzione di Decanoato con  $pH11$  la droplet percorre un tratto più lungo rispetto alle altre con pH maggiori e inoltre sono distinguibili il punto di inizio e il punto di fine. Per le altre due soluzioni non si può dire lo stesso, infatti i punti di inizio e fine del percorso risultano, se non coincidenti, molto vicini.

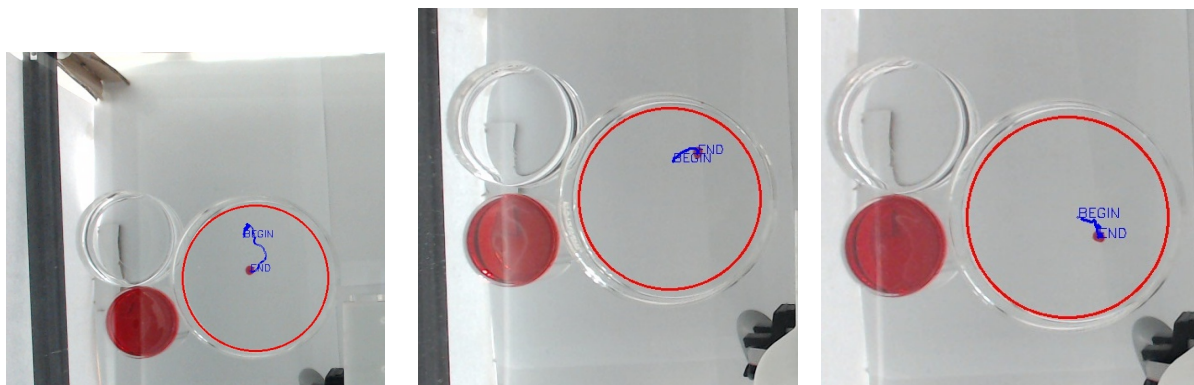


Figura 4.3: Acido decanoico 20mM a pH11, 12 e 13

Nelle soluzioni 20mM si osserva, per tutti e tre i pH analizzati, che la droplet compie dei percorsi brevi come se l'alta concentrazione di Decanoato fornisse un ostacolo ad un movimento più lineare e complesso.

Nella tabella 4.1 sono riportati i valori del coefficiente  $k$  per ogni esperimento eseguito ed i valori medi accanto. Come osservato dalle immagini raccolte, la soluzione con  $pH11$  risulta avere il coefficiente medio minore, per cui il movimento può essere considerato il migliore.



Tabella 4.1: Valori del  $k$  e valori medi per ogni classe di pH delle soluzioni  $20mM$

pH	$k$	$k$ medio
11	0,573	2,013
11	2,429	
11	1,458	
11	3,594	
12	4,075	3,357
12	3,329	
12	3,284	
12	2,74	
13	2,236	4,7425
13	2,932	
13	5,231	
13	8,571	

#### 4.2.2 10mM

Nelle seguenti figure si osservano i percorsi della droplet in soluzioni  $10mM$  di Decanoato, per ogni classe di pH. Si osserva subito che i percorsi risultano più lunghi degli esperimenti precedenti ed in tutti e tre i casi si possono distinguere con chiarezza i punti di inizio e di fine percorso.



Figura 4.4: Acido decanoico 10mM a pH11, 12, 13

Nella tabella 4.2 vengono riportati i valori di  $k$  e i valori medi per ogni classe di pH. Si osserva, anche in questo caso, che la soluzione con  $pH11$  rivela il risultato migliore.

Tabella 4.2: Valori del  $k$  e valori medi per ogni classe di pH delle soluzioni  $10mM$

pH	$k$	$k$ medio
11	0,671	0,373
11	0,074	
11	0,538	
11	0,209	
12	0,566	0,50425
12	0,241	
12	0,763	
12	0,447	
13	0,876	0,5925
13	0,338	
13	0,732	
13	0,424	

#### 4.2.3 5mM

Nell'ultima classe di molarità si osservano dei percorsi lunghi e lineari. Nelle soluzioni con  $pH11$  e  $pH13$  la droplet compie un percorso preciso e direzionale, nella soluzione a  $pH12$  tuttavia, il percorso è più breve. Questo può essere dovuto a fattori esterni che posso aver influenzato l'esperimento.

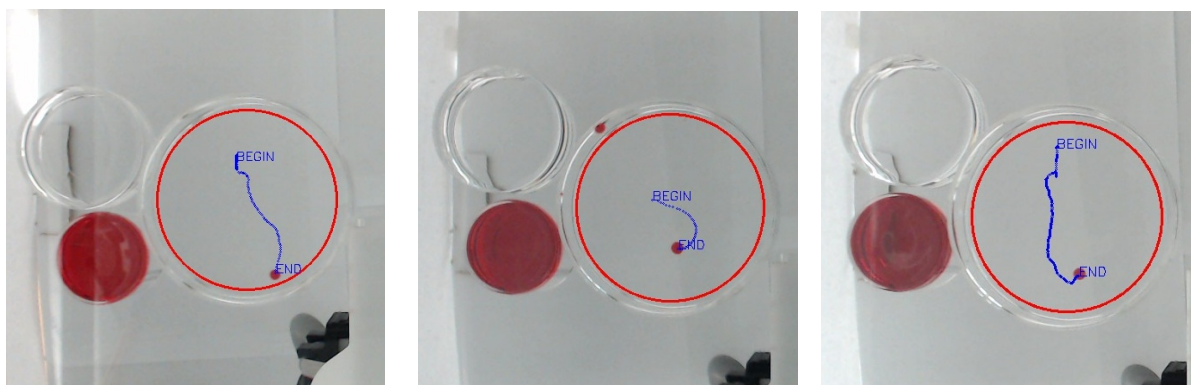


Figura 4.5: Acido decanoico 5mM a pH11, 12 e 13

Nella tabella 4.3 vengono riportati i valori di  $k$  ed i valori medi per ogni classe di pH. Questi valori, comparati a quelli delle tabelle precedenti risultano i più bassi. Infatti gli spostamenti compiuti nelle soluzioni  $5mM$  sono i più precisi.

Tabella 4.3: Valori del  $k$  e valori medi per ogni classe di pH delle soluzioni  $5mM$

pH	k	k medio
11	0,18	0,209
11	0,25	
11	0,213	
11	0,194	
12	1,837	0,67
12	0,204	
12	0,393	
12	0,246	
13	0,171	0,327
13	0,474	
13	0,289	
13	0,375	

#### 4.2.4 Considerazioni generali

In tutti gli esperimenti è stato notato che la droplet non risponde con il movimento chemiotattico immediatamente dopo l'aggiunta del sale. Probabilmente questo periodo di latenza è il tempo che il gradiente del sale impiega a raggiungere la droplet dal punto in cui è stato inserito. Dopo questo periodo di latenza si è osservato un movimento agitato iniziale nel primo punto in cui la droplet viene riconosciuta dal tracking. Questo movimento oscillatorio può essere dovuto alla prima interazione tra il sale e i confini della droplet. Si è inoltre osservato, una volta che la droplet si avvicina al punto in cui è stato inserito il sale, che questa compie un movimento locale casuale ed oscillatorio, simile a quello compiuto al momento della prima interazione con il sale. Nelle soluzioni  $10mM$  e  $5mM$  la droplet compie dei percorsi più lunghi, arrivando molto vicina al punto di inserimento del sale. Tuttavia, nelle soluzioni  $20mM$  si osservano dei movimenti più brevi, è come se la droplet facesse fatica a riconoscere il gradiente del sale compiendo un movimento minimo. Bisogna tenere in considerazione che questo movimento può essere stato influenzato da flussi di aria capaci di creare dei moti convettivi all'interno del sistema. I moti possono agire come forza contraria alla direzione del movimento. Un altro fattore esterno che può portare alla creazione di moti convettivi può essere stato l'inserimento della punta della siringa all'interno della superficie dell'acido decanoico nella Petri. Tuttavia queste ipotesi potranno essere confermate attraverso la ripetizione di un maggior numero di esperimenti.

Tabella 4.4: Tabella riassuntiva

molarità \ pH	11	12	13
	11	12	13
20mM	2,013	3,357	4,742
10mM	0,373	0,504	0,592
5mM	0,209	0,67	0,327

Nella tabella riassuntiva 4.4 sono stati raccolti tutti i valori medi di ogni combinazione. Come si può osservare il coefficiente di precisione migliore si ha nella soluzione  $5mM$  con  $pH11$ . Inoltre, le soluzioni  $20mM$  hanno i coefficienti maggiori tra tutte, sinonimo di una minore precisione della droplet nel raggiungimento della sorgente di sale.

# 5 Conclusioni e Sviluppi Futuri

## 5.1 Argomentazione dei risultati

## 5.2 Problemi nella struttura del robot

La struttura di EvoBot è stata progettata seguendo il modello di una stampante 3D. I layers che lo costituiscono sono ancorati allo scheletro esterno con delle leve bloccanti. Questo fa pensare che la struttura sia facilmente regolabile dal singolo utente. In realtà spostare i layers risulta alquanto complesso e macchinoso se non con l'aiuto di un'altra persona. L'*actuation layer* contiene la testa del robot e sia i cavi che collegano la scheda Arduino che il cavo di corrente dei motori che muovono la testa del robot sono esterni alla cornice in metallo per cui durante il movimento bisogna prestare attenzione a posizionarli nel modo corretto.

La struttura del robot prevede la presenza di un piano di plastica bianca da posizionare al di sopra del modulo siringhe per avere una superficie più omogenea nello sfondo del video registrato dalla camera. Lo strato di plastica non era presente al momento dell'arrivo del robot nel laboratorio quindi si è ricorsi a sostituirlo con un cartone di colore bianco. Questo ha permesso un migliore riconoscimento della forma della droplet avendo come sfondo una superficie omogenea.

### 5.2.1 La testa ed il modulo siringa

La *head* di EvoBot è composta da due PCBs (printed circuit board), circuiti stampati costituiti da connettori a molla per creare i contatti elettrici con i moduli. L'inserimento e l'estrazione del modulo siringa deve avvenire quindi con delicatezza in quanto ad ogni movimento i connettori possono danneggiarsi ed il modulo resterebbe elettricamente scollegato.

Tutte le componenti del modulo siringa sono state prodotte utilizzando una stampante 3D. Il materiale di produzione risulta quindi in plastica rigida. Questa proprietà conferisce ad ogni pezzo rigidità ma allo stesso tempo fragilità.

Un esempio di questa fragilità è stata la rottura della base contenente il motore dello stantuffo. Durante le prime fasi del lavoro il bastoncino a spirale, che unisce lo stantuffo al suo motore, per il movimento verticale, tendeva a perdere il passo all'interno del motore causando la fuoriuscita di questo dalla base in cui era fissato. Questo imprevisto ha comportato numerose interruzioni delle attività in quanto non si disponeva dei moduli siringa supplementari necessari per la sostituzione. Il problema è stato risolto nella struttura delle siringhe di nuova generazione fissando un blocco con delle viti sulla parte superiore della base che contiene il motore. Un altro dei problemi incontrati ha riguardato il lavaggio del corpo delle siringhe in quanto esse sono alloggiate in dei sostegni ad incastro. E' pertanto necessario estrarla per eseguire almeno un lavaggio del corpo della siringa con etanolo così che non restino residui di nessuna soluzione all'interno. Il lavaggio dovrebbe avvenire alla fine di ogni giornata di lavoro ed estrarre la siringa dal sostegno, a lungo termine potrebbe portare alla rottura di questo. Il rimedio adottato è stato quello di utilizzare quantità di liquido sufficientemente ridotte in modo che il loro volume restasse contenuto nel puntale senza invadere il corpo della siringa, almeno per quanto riguarda il decanolo, sostanza tossica che può provocare irritazioni oculari. Per gli esperimenti condotti si è riusciti a rispettare il limite ma in futuro si potrebbe aver bisogno di quantità di liquidi maggiori. Si è pensato ad una possibile soluzione: implementare un ciclo di "lavaggi" della siringa aspirando e spingendo fuori ripetutamente dell'etanolo da un pozzetto posizionato sull'*experimental layer*. L'etanolo è un alcol incolore impiegato come solvente in laboratorio; è adatto a solubilizzare sia sostanze organiche che inorganiche. Nel capitolo 4 si è parlato dell'influenza della punta della siringa nel momento in cui vengono inseriti i liquidi nel sistema. Il fattore da tenere quindi in considerazione è la velocità con cui il liquido viene immesso, ovvero la velocità di spostamento del plunger. Per controllare questa specifica è stata implementata una API specifica da lanciare dopo la calibrazione

della testa del robot. Diversamente dalla calibrazione però, l'impostazione non viene mantenuta dopo lo spegnimento del robot. Questo porta a dover rilanciare il programma ogni volta che si inizia un nuovo esperimento. Ci si propone quindi di trovare una soluzione da implementare direttamente nel programma di raccolta dati così da ottimizzare il tempo di esecuzione degli esperimenti.

## 5.3 Conduzione degli esperimenti

Come accennato nel capitolo 4 di questo studio, è possibile che alcuni degli esperimenti condotti siano stati in parte influenzati da fattori esterni alla struttura del robot. Inoltre ci si propone, per studi futuri, di automatizzare la gestione dell'esperimento.

### 5.3.1 Influenza di agenti esterni

La cornice che racchiude i *layers* non ha una chiusura ermetica per cui i flussi di aria creati attorno al robot possono aver influito sul movimento della droplet. Questo problema è stato risolto in parte apponendo dei fogli di carta sui lati esterni ma risulta evidente la necessità di una copertura più robusta. Un flusso di aria può influire sul sistema facendo muovere la droplet più velocemente o spostandola in zone in cui il gradiente di sale non è sufficientemente forte da attirarla. I valori del percorso fatto e del tempo impiegato non risulterebbero quindi estremamente puntuali. Questo problema ci ha condotto a registrare il punto di inizio della droplet non come quello in cui questa viene inserita dalla siringa ma come quello in cui viene riconosciuta dal programma. Infatti le posizioni C e D mostrate nella figura 4.2, sono arbitrarie e variano leggermente da esperimento ad esperimento. Si è cercato tuttavia, per mantenere lo spazio degli esperimenti sufficientemente uniforme, di seguire sempre lo schema proposto dalla figura 4.2. Questo non è sempre stato possibile in quanto appunto, la droplet posizionata in posizione C, essendo influenzata dai moti convettivi, si muoveva in altre posizioni prima che il sale venisse inserito nel sistema.

### 5.3.2 Modifiche nel protocollo e automazione

Gli sviluppi futuri di questo studio prevedono l'apporto di modifiche al protocollo usato e l'automazione dei vari processi che lo compongono. Un primo parametro da modificare è la distanza tra il sale e la droplet, questa potrebbe assumere un valore definito in precedenza. Tuttavia, per poter avere la certezza che la distanza abbia sempre lo stesso valore si devono prima risolvere i problemi relativi allo spostamento involontario della droplet. Per facilitare questa specifica si potrebbe pensare di eseguire gli esperimenti su una Petri rettangolare e non rotonda, considerando però che questo ci distanzerebbe dall'ambiente reale in cui si muovono le cellule organiche, più vasto e meno limitato. Un altro parametro che si può decidere di impostare è quello relativo al tempo della modalità di tracciamento. Se infatti si impostasse un tempo uguale per tutte le combinazioni si potrebbero osservare anche altre caratteristiche del movimento. Entrambe queste modifiche verrebbero applicate creando un programma per controllare il robot in modo automatico. Si possono impostare automaticamente i movimenti delle siringhe, della testa del robot e le quantità di liquido da aspirare ed immettere nel sistema. Si avrebbero così degli esperimenti identici in ogni ripetizione, più veloci nell'esecuzione e ripetibili un numero maggiore di volte.

### 5.3.3 Conclusioni generali

aggiungi anche un pezzettino in cui dici che il 5mM è più fico del 20, e che dagli esperimenti che hai fatto puoi dire la droplet si muove meglio in certe condizioni (e specifichi quali) e peggio in altre e specifichi, come già elencato nei risultati. . . nn è una ripetizione, in questa parte dovresti argomentare i tuoi risultati nn solo specificare tutta la roba che nn ha funzionato, discuti prima i risultati e poi aggiungi tutte le critiche dopo aver messo una frase iniziale nella quale specifichi le critiche servono come base per formular le prospettive future

# Bibliografia

- [1] Decanolo. <https://en.wikipedia.org/wiki/1-Decanol>. ultimo accesso 27/02/2016.
- [2] Oil red o. [https://en.wikipedia.org/wiki/Oil\\_Red\\_O](https://en.wikipedia.org/wiki/Oil_Red_O). ultimo accesso 27/02/2016.
- [3] Opencv. <http://opencv.org/>. ultimo accesso 21/02/2016.
- [4] Pronterface. <http://www.pronterface.com/>. ultimo accesso 21/02/2016.
- [5] robotic platform. <https://blogit.itu.dk/evoblissproject/overview/progress/evolutionary-robotic-platform/>. ultimo accesso 18/02/2016.
- [6] Kurt S. Zänker Frank Entschladen. *Cellmigration: signalling and mechanisms*. Karger, 2009.
- [7] Paul Martin. Wound healing—aiming for perfect skin regeneration. *Science*, 276(5309):75–81, 1997.
- [8] † Martin M. Hanczyc, ‡ Taro Toyota, ‡ Takashi Ikegami, † Norman Packard, , and ‡ Tadashi Sugawara\*. Fatty acid chemistry at the oil–water interface: self-propelled oil droplets. *Journal of the American Chemical Society*, 129(30):9386–9391, 2007. PMID: 17616129.
- [9] Hiroki Matsuno, Martin M. Hanczyc, and Takashi Ikegami. *Progress in Artificial Life: Third Australian Conference; ACAL 2007 Gold Coast, Australia, December 4-6, 2007 Proceedings*, chapter Self-maintained Movements of Droplets with Convection Flow, pages 179–188. Springer Berlin Heidelberg, 2007.
- [10] Evanthia T. Roussos, John S. Condeelis, and Antonia Patsialou. Chemotaxis in cancer. *Nat Rev Cancer*, 11(8):573–587, 08 2011.
- [11] Waław Szybalski. *In Vivo and in Vitro Initiation of Transcription*. New York: Plenum Press, 1974.
- [12] Jitka Čejková, Matěj Novák, František Štěpánek, and Martin M. Hanczyc. Dynamics of chemotactic droplets in salt concentration gradients. *Langmuir*, 30(40):11937–11944, 2014. PMID: 25215439.