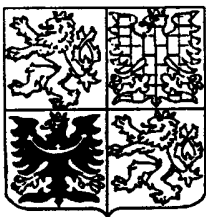


ČESKÁ
REPUBLIKA

(19)



ÚŘAD
PRŮMYSLÉHO
VLASTNICTVÍ

ZVEŘEJNĚNÁ PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

(12)

(22) 26. 10. 89

(40) 13. 10. 93

(21) 6061-89. V

(13) A3

5(51)

A 61 B 5/08

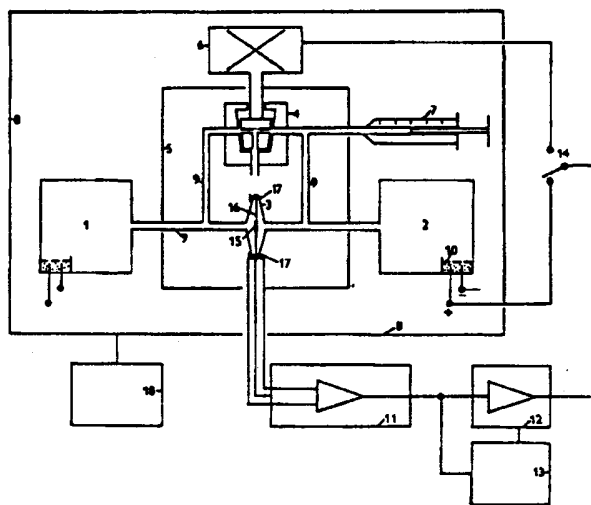
G 01 N 7/18

(71) VOD INTERECO, Bystřice nad Olší, CZ;

(72) Sláma Karel dr., Praha, CZ;

(54) **Mikrorespirograf pro vyhodnocování
biotechnologických procesů a metabolických
změn buněk, tkání a organismů**

(57) Plynulá registrace spotřeby kyslíku a vylučování oxidu uhličitého buňkami a tkáněmi, pracující na volumetrickém principu a obsahující elektronický převodník (3) tlakových rozdílů mezi respirační nádobkou (2) a kompenzační nádobkou (1), přičemž tensometrická jednotka (11) s elektronickým převodníkem (3) je propojena s generátorem (10) kyslíku přes regulační spínací obvod (12). Elektronický převodník (3) je tvořen polovodičovými tenzometry (15) umístěnými na membráně (16) o průměru 6 až 20 mm, tloušťce 0,01 a 0,08 mm, která dělí prostor elektronického převodníku (3) na dvě stejné části, přičemž vnitřní prostor elektronického převodníku (3) na každé straně membrány (16) je v rozmezí 1 až 300 l a obě části jsou spojeny vřemcem regulačních šroubů (17).



Mikrorespirograf pro vyhodnocování biotechno-
logických procesů a metabolických změn buněk,
tkání a organismů

Vynález se týká zařízení pro plynulou registraci spotřeby kyslíku a vylučování oxidu uhličitého buňkami a tkáněmi, pracující na volumetrickém principu a obsahující elektronický převodník tlakových rozdílů mezi respirační a kompenzační nádobkou, přičemž řečený elektronický převodník je napojen na tensometrickou jednotku a respirační nádobka je opatřena generátorem kyslíku.

Pro měření spotřeby kyslíku organismů a tkání byla vyvíjena celá řada respirometrických technik. Původní přístroje byly spirometry a spirografy používané v lékařství, jejichž citlivost se pohybovala řádově v ml spotřebovaného kyslíku. Druhou generaci těchto přístrojů představují mikrorespirometry používané k výzkumu metabolických změn u různých živočichů a rostlin, pracující v oblasti μl hodnot. Třetí generace je v současné době zastoupena elektronickými přístroji, jako jsou kyslíkové oxygrafy a ultramikrorespirometry, schopné zaznamenávat spotřeby kyslíku v nanolitrovém množství. V souborné práci věnované měření spotřeby kyslíku malých vzorů tkání /viz T.J.Bradley a T.A.Miller: Measurement of ion transport and metabolic rate in insects, Springer Verlag, New York, Berlin, Heidelberg, Tokyo, 1984, str.101/ byly shrnuty základní mikrorespirometrické přístroje s velkou citlivostí. Tyto přístroje jsou založené na přímých volumetrických principech, dále jsou zde popsány elektrolytické respirometry, polarografické respirometry využívající kyslíkových elektrod, dále diaferometrické průtokové respirometry, analysátory vydechaného oxidu uhličitého založené na absorpci oxidu uhličitého CO_2 v infračervené oblasti, apod.

Nejvíce prakticky jsou rozšířeny v současné době oxygrafy, používající kyslíkové elektrody. Tyto přístroje jsou velmi citlivé, jejich nevýhodou však je nepřímé měření spotřeby kyslíku na základě změn koncentrace O_2 v respirační nádobce. Velký pokrok v elektronice, zvláště dostupnost polovodičových tenzometrů, schopných přenášet a měnit na změnu elektrického proudu nejjemnější mechanické deformace, umožnil konstrukci vysoce citlivého přístroje, registrujícího přímo nanolitrové změny ve spotřebě kyslíku. Tento přístroj se ukázal být vhodný pro měření metabolické činnosti malých vzorků explantovaných hmyzích tkání. Pomocí tohoto skanovacího mikrorespirografu /viz citaci výše/, bylo možné získat průběžné záznamy metabolických změn malých množství buněk a tkání.

Nevýhodou výše uvedené metody je, že zvýšení citlivosti v nl oblasti je dosaženo mimo jiné zmenšením objemu respirační nádoby pod 1 ml. Následkem toho je množství kyslíku použitelného k dýchání měřeného objektu značně omezené. Během delšího měření dochází velmi rychle k jeho spotřebě a k poklesu jeho parciálního tlaku uvnitř respirační nádoby, a tím k postupnému zmenšování metabolické aktivity, spojené případně s uhynutím měřených buněk. Další nevýhody dosavadních metod měření metabolismu buněčných suspenzí spočívají v tom, že používají velké množství tkáně, řádově miligramy, nebo tkáňových suspenzí, řádově mililitry. Navíc používají kapalných termoregulačních medií a vydatného míchání reakční směsi k zajištění rovnoměrného přísunu kyslíku k buňkám, neboť difuze O_2 v kapalném prostředí je asi 500 milionkrát pomalejší než v plynné fázi.

Tyto nevýhody odstraňuje zařízení podle vynálezu, jehož podstata spočívá v tom, že tensometrická jednotka s elektronickým převodníkem tlaku je propojena s generátorem kyslíku uvnitř respirační nádoby přes regulační spínací obvod. Elektronický převodník může být tvořen polovodičovými tensometry umístěnými na membráně o průměru 6 až 20 mm, tloušťce 0,01 až 0,08 mm, dělící prostor elektronického převodníku na dvě stejné části, přičemž vnitřní prostor elektronického převodníku na každé straně membrány je v rozmezí 1 až 300 μl a obě stejné

části jsou spojeny věncem adjustačních šroubů.

Výhoda zařízení podle vynálezu spočívá v tom, že nahrazuje kyslík spotřebovaný tkáněmi kyslíkem elektrolyticky vyrobeným přímo uvnitř respirační nádoby. To umožňuje dlouhodobý průběžný záznam metabolických změn malých vzorků tkání při zachování veliké citlivosti měření a současném zachování stálého parciálního tlaku O_2 v respirační nádobce po celou dobu měření. V kombinaci s vysokou citlivostí elektronických převodníků tlaku umožňuje zařízení plně autoregulační, dlouhodobé monitorování změn v látkové přeměně mikrogramových množství buněk a tkání s přesností záznamu pikolitrových veličin spotřeby O_2 nebo vylučování oxidu uhličitého CO_2 za minutu.

Další výhodou tohoto vynálezu je, že díky veliké citlivosti měření se mohou používat extrémně malá množství buněk a tkání, řádově mikrogramy, nebo tkáňových suspenzí, řádově mikrolitry. Tím je zaručen dostatečný přívod kyslíku až k mitochondriím buněk bez nutnosti míchání, které je pro některé buněčné kultury přímo škodlivé. Použitím větších nádobek a zmenšením citlivosti je možno přístroj podle vynálezu použít jako univerzální mikrorespirograf pro záznam metabolických změn malých i velkých organismů, jako jsou vajíčka a různá vývojová stadia hmyzu, klíčící embrya nebo části rostlin, nebo laboratorní zvířata.

Příklad provedení zařízení podle vynálezu je znázorněn na připojeném výkresu, představujícím schematický náčrtek mechanické i elektronické části zařízení.

Kompenzační nádobka 1 a respirační nádobka 2 jsou vzájemně oddělené membránou 16 elektronického převodníku 3. Kromě toho jsou také propojeny navzájem spojovacími trubičkami 9 o vnitřním průměru menším než 0,7 mm, napojenými na ventil 4 pro uzavírání nebo otevírání prostoru kompenzační nádoby 1 a respirační nádoby 2 do vnějšího prostoru. Ventil 4 je připojen k servomotoru 6, který je přes přepínač 14 napojen na regulační spínací obvod 12. Respirační nádobka 2 je také spojena prostřednictvím spojovací trubičky 9 s mikrostří-

- kačkou 7 pro přímou objemovou kalibraci přístroje. Elektronický převodník tlaku 3, spojovací trubičky 9 a ventil 4 jsou umístěny ve vnitřním kovovém plášti 5. Vnitřní kovový plášť 5, kompenzační nádobka 1, respirační nádobka 2, mikrostríkačka 7 a servomotor 6 jsou uloženy v termoizolačním plášti 8, který je připojen k termoregulační jednotce 13.

Elektronický převodník 3 je tvořen polovodičovými tenzometry 15 umístěnými na membráně 16 o průměru 6 až 20 mm, tloušťce 0,01 až 0,08 mm, dělicí prostor elektronického převodníku 3 na dvě stejné části, přičemž vnitřní prostor elektronického převodníku 3 na každé straně membrány 16 je v rozmezí 1 až 300 μ l a obě stejné části jsou spojeny věncem adjustačních šroubů 17. Tenzometry 15 elektronického převodníku 3 jsou připojeny ke vstupu tensometrické jednotky 11, jejíž výstup je připojen jednak ke vstupu regulačního spínacího obvodu 12 a jednak k registračnímu a vyhodnocovacímu zařízení 13 propojenému zpětně s regulačním spínacím obvodem 12, jehož výstup vede přes přepínač 14 buď do elektrod generátoru 10 kyslíku nebo do servomotoru 6. V kompenzační nádobce 1 je uložen rovněž generátor 10 kyslíku, jehož elektrody nejsou zapojeny.

Základní elektronickou součástí zařízení je tensometrická jednotka 11, určená pro přesné měření použitím odporových můstků, zásobujících tenzometry 15 elektronického převodníku 3 napájecím napětím, jehož změny závislé na mechanické deformaci membrány 16 jsou pak zesilovány, dekodovány a přeměněny na výstupní signál přicházející na vstup regulačního spínacího obvodu 12 a dále na registrační a vyhodnocovací zařízení 13, představované lineárním zapisovačem, osciloskopem nebo paměťovým počítačem. Regulační spínací obvod 12 ovládá činnost servomotoru 6 spojeného s ventilem 4, nebo činnost generátoru 10 kyslíku nastavením pásmových propustí na začátku a na konci měřeného rozsahu. Generátor 10 kyslíku pracuje na elektrolytickém principu a je tvořen platinovou $/+ /$ a měděnou $/- /$ elektrodou, které jsou umístěny v nasyceném roztoku CuSO_4 s přídavkem 1% siranu železnatého FeSO_4 proti tvorbě ozonu. Na rozdíl od elektrolytických respirátorů /viz citaci uvedenou výše, str. 163/, zařízení podle vynálezu nepoužívá elektrolytic-

ký princip přímo k měření hodnot spotřeby kyslíku, ale k automatickému nastavování tlakových hodnot a k průběžnému doplňování množství kyslíku spotřebovaného měřenými organismy. Skutečné měření spotřeby kyslíku a automatické nastavování nuly jsou v tomto zařízení uskutečňovány prostřednictvím elektronického převodníku 3, tensometrické jednotce 11 a regulačního spínacího obvodu 12.

Při práci se zařízením podle vynálezu musí být na začátku měření ventil 4 v poloze "otevřeno", pásmové propusti regulačního spínacího obvodu 12 pro zapínání a vypínání generátoru 10 kyslíku se nastaví na příslušné hodnoty, dále se nastaví rozsah citlivosti měření na tensometrické jednotce 11 a odpovídající proud do elektrod generátoru 10 kyslíku se pak nastaví na regulačním spínacím obvodu 12. Měřený objekt se umístí spolu s absorbentem oxidu uhličitého CO_2 do respirační nádoby 2, která se připojí k příslušnému vývodu z elektronického převodníku 3. V zařízení je možno použít i několika samostatných respiračních nádobek 2, které jsou společně umístěny v termoizolačním plášti 8 a jsou postupně připojovány k elektronickému převodníku 3 pomocí neznázorněného vícecestného miniaturního ventálu.

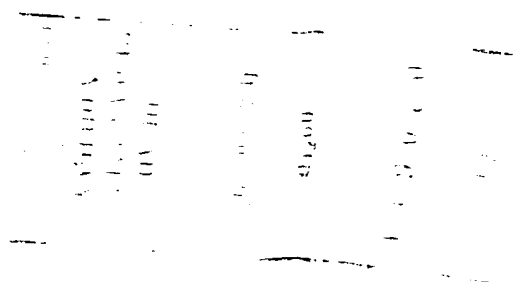
Po 10 až 15 minutách potřebných pro ustálení teploty se začne měření uzavřením ventilu 4 elektrickým povelém přes přepínač 14. Registrační a vyhodnocovací zařízení 13 začne ihned ukazovat úbytek tlaku v respirační nádobce 2, který je úměrný spotřebovanému kyslíku. Po dosažení maxima nastaveného hodnotou horní pásmové propusti na regulačním a spínacím obvodu 12 dochází k vyslání elektrického signálu na přepínač 14, což má za následek buď krátkodobé otevření ventilu 4, a tím vyrovnání tlaku v kompenzační nádobce 1 a respirační nádobce 2 na původní nulovou hodnotu, nebo, podle polohy přepínače 14, dojde k průtoku elektrického proudu generátorem 10 kyslíku, který bude vyrábět plynný O_2 rychlostí odpovídající nastavenému proudu na regulačním a spínacím obvodu 12, až do okamžiku, kdy hodnoty na výstupu dosáhnou spodního limitu pásmové propusti pro vypnutí elektrolýzy. V této době je indikátor registračního a vyhodnocova-

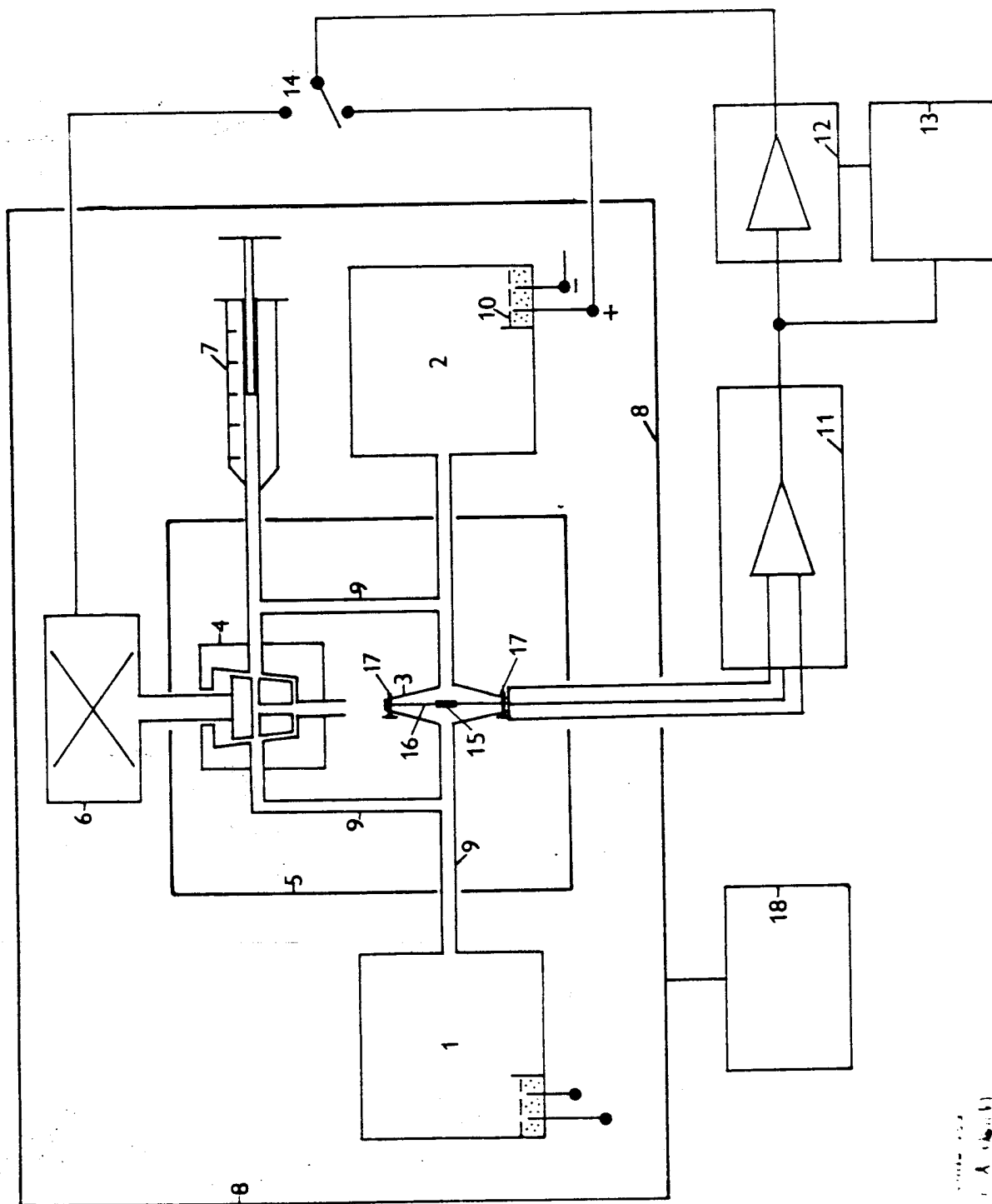
ciho zařízení 13 zpět na původní hodnotě a celý cyklus měření se samočinně opakuje.

Zařízení podle vynálezu je možno s výhodou využít pro měření nanolitrových a pikolitrových množství spotřeby kyslíku, zejména pro monitorování průběhu biotechnologických postupů na základě záznamu spotřeby kyslíku nebo vylučování oxidu uhličitého v miniaturních, submikrolitrových vzorků reakčních směsí, dále k měření metabolické aktivity mikroorganismů, tkáňových kultur buněk a buněčných suspenzí, k výzkumu buněčných vývojových cyklů, k měření metabolismu mikroskopických vzorků živočišných a rostlinných tkání, např. pro srovnání normální a nádorové tkáně, dále je možno zařízení použít k měření metabolické aktivity malých organismů, jako jsou vajíčka hmyzu a jiných živočichů, různá vývojová stadia členovců, klíčící semena a klíčky rostlin v biotechnologických postupech a s menšími úpravami velikosti báníček je možno zařízení použít jako vysoce citlivého, univerzálního respirografu s kontinuálním záznamem.

P A T E N T O V E N Á R O K Y

1. Zařízení pro plynulou registraci spotřeby kyslíku a vy-
lučování oxidu uhličitého buňkami a tkáněmi vytvořený na
bázi přímého volumetrického principu, obsahující elektro-
nický převodník tlakových rozdílů mezi respirační a kom-
penzační nádobkou, přičemž elektronický převodník je na-
pojen na tensometrickou jednotku a respirační nádobka je
opatřena generátorem kyslíku, vyznačené tím, že tensometrická
jednotka /11/ s elektronickým převodníkem /3/ je zpětno-
vazebně propojena s generátorem /10/ kyslíku přes regulační
spínací obvod /12/.
2. Zařízení podle bodu 1 vyznačené tím, že elektronický pře-
vodník /3/ je tvořen polovodičovými tenzometry /15/ umístě-
nými na membráně /16/ o průměru 6 až 20 mm, tloušťce 0,01
až 0,08 mm, rozdělující prostor elektronického převodníku
/3/ na dvě stejné části, přičemž vnitřní prostor elektro-
nického převodníku /3/ na každé straně membrány /16/ je
v rozmezí 1 až 300 μ l a obě stejné části jsou spojeny
věncem adjustačních šroubů /17/.





Check for proper operation
of the system (A and B)
and for proper operation
of the system (A and B)