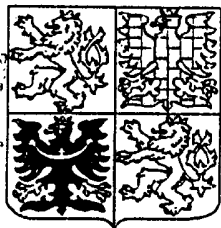


ČESKÁ  
REPUBLIKA

(19)



ÚŘAD  
PRŮMYSLOVÉHO  
VLASTNICTVÍ

# UŽITNÝ VZOR

(21) 446-93  
(22) 26.10.89  
(32) 26.10.89  
(33) CZ  
(47) 24.03.93  
(43) 12.05.93

(11) 246

(13) U

(51) A 61 B 5/08  
G 01 N 7/18  
A 61 B 5/08  
G 01 N 7/18

(71) INTERECO, výrobně obchodní družstvo, Bystřice nad  
Olšou, CZ;

(54) Mikrorespirograf

Mikrorespirograf

Oblast techniky

PŘÍL. VLASTNICTVÍ PRŮM. A OBYV. URÁD	24. II. 93	007898	č.j.
		DOŠLO	

Technické řešení se týká mikrorespirografu pro vyhodnocování biotechnologických procesů a metabolických změn buněk, tkání a organismů s plynulou registrací spotřeby kyslíku a vylučování oxidu uhličitého buňkami a tkáněmi, pracujícího na volumetrickém principu. Mikrorespirograf obsahuje elektronický převodník tlakových rozdílů mezi respirační a kompenzační nádobkou, přičemž řešený elektronický převodník je napojen na tenzometrickou jednotku a respirační nádobka je opatřena generátorem kyslíku.

Dosavadní stav techniky

Při měření spotřeby kyslíku organismů a tkání byla vyvinuta 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 ul 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 vzorků tkání / 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 přírodních volumetrických principech, dále jsou zde popsány elektrolytické respirometry, polarografické respirometry, využívající kyslíkových elektrod, dále diaferometrické průtokové respirometry, analyzátoři vydechovaného oxidu uhličitého za-

X ložené na absorpci oxidu uhličitého  $\text{CO}_2$  v infračervené oblasti, a pod.

Nejvíce prakticky rozšířené jsou v současné době oxygrafy, používající kyslíkové elektrody. Tyto přístroje jsou velmi citlivé, jejich nevýhodou však je nepřímé měření spotřeby kyslíku na základě změn koncentrace  $\text{O}_2$  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 podle výše uvedené citace bylo možné získat průběžné záznamy metabolických změn malých množství buněk a tkání.

Nevýhodou výše uvedené metody je, že zvýšení citlivosti v ml oblasti je dosaženo mimo jiné zmenšením objemu respirační nádobky 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 nádobky, 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 kyslíku v kapalném prostředí je asi 500 milionkrát pomalejší než v plynné fázi.

### Podstata technického řešení

Uvedené nevýhody odstraňuje Mikrorespirograf obsahující elektronický převodník tlakových rozdílů mezi respirační a kompenzační nádobkou, přičemž elektronický převodník je napojen na tenzometrickou jednotku a respirační nádobka je opatřena generátorem kyslíku, jehož podstata spočívá v tom, že tenzometrická jednotka s elektronickým převodníkem je zpětnovazebně propojena s generátorem kyslíku přes regulační spínací obvod pro nastavení startu a rychlosti výroby kyslíku v závislosti na citlivosti měření.

Elektronický převodník může být tvořen polovodičovými tenzometry umístěnými na membráně o průměru 6 až 20 mm, tloušťce 0,01 až 0,08 mm rozdělující prostor elektronického převodníku na dvě stejné části, přičemž vnitřní prostor elektronického převodníku na každé straně membrány je v rozmezí 2 až 300  $\mu\text{l}$  a obě stejné části jsou spojeny věncem adjustačních šroubů.

Výhoda zařízení podle řešení 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 kyslíku 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 kyslíku nebo vylučování oxidu uhličitého  $\text{CO}_2$  za minutu.

Další výhodou tohoto řešení 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 řešení 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.

#### Přehled obrázků na výkrese

Obrázek na připojeném výkrese znázorňuje schematický náčrtek mechanické a elektronické části mikrorespirografu.

#### Příklady provedení

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 prostory kompenzační nádobky 1 a respirační nádobky 2 do vnějšího prostoru. Ventil 4 je připojen k servomotoru 6, který je přes přepínač 14 napojen na regulační spínací obvod 12 pro nastavení startu a rychlosti výroby kyslíku v závislosti na citlivosti měření. Respirační nádobka 2 je také spojena prostřednictvím spojovací trubičky 9 s mikrostřikačkou 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, mikrostřikačka 7 a servomotor 6 jsou uloženy v termoizolačním plášti 8, který je připojen k termoregulační jednotce 17.

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, rozdělující 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  $\mu$ l a obě stejné části jsou spojeny věncem adjustačních šroubů 18. Tenzometry 15 elektronického převodníku 3 jsou připojeny ke vstupu tenzometrické jednotky 11, jejíž výstup je připojen jednak ke vstupu regulačního spínacího obvodu 12 startu a rychlosti výroby kyslíku v závislosti na citlivosti měření 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 tenzometrická 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, dekódovány 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 startu a rychlosti výroby kyslíku v závislosti na citlivosti měření. Generátor 10 kyslíku pracuje na elektrolytickém principu a je tvořen platinovou /+ / a měděnou /- / elektrodou, které jsou umístěny v nasyceném roztoku  $\text{CuSO}_4$  s přísádkem 1%  $\text{FeSO}_4$  proti tvorbě ozonu. Na rozdíl od elektrolytických respirátorů popsaných ve výše uvedené citaci nepoužívá zařízení podle vynálezu elektrolytický 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, tenzometrické jednotky 11 a regulačního spínacího obvodu 12, který není použit k měření, ale pouze k automatickému řízení provozu přístroje.

Při práci se zařízením podle řešení musí být na začátku měření ventil 4 v poloze "otevřeno", nastaví se kritické hodnoty regulačního spínacího obvodu 12 pro zapínání a vypínání generátoru 10 kyslíku, dále se nastaví rozsah citlivosti měření na tenzometrické jednotce 11 a odpovídající proud do elektrod generátoru 10 kyslíku se také nastaví na regulačním spínacím obvodu 12 pro nastavení startu a rychlosti výroby kyslíku v závislosti na citlivosti měření. Měřený objekt se umístí spolu s absorbentem oxidu uhličitého CO<sub>2</sub> 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 ventilu.

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 s spínacím obvodu 12 dochází k vyslání elektrického signálu na spínač 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<sub>2</sub> rychlosti odpovídající nastavenému proudu na regulačním a spínacím obvodu 12 až do okamžiku, kdy hodnoty na výstupu dosáhnou spodního limitu pro vypnutí elektrolyzy. V této době je

indikátor registračního a vyhodnocovacího zařízení 13 zpět na původní hodnotě a celý cyklus měření se samočinně opakuje.

#### Průmyslová využitelnost

Zařízení podle řešení 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 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, například pro srovnání normální a nádorové tkáně, dále je možno zařízení použít k měření metabolické aktivity malých organismů, jako jsou vajíčka hmyzu a jiných živočichů, různé vývojová stadia členovců, klíčící semena a klíčky rostlin v biotechnologických postupech a s menšími úpravami velikosti baniček je možno zařízení použít jako vysoce citlivého univerzálního respirografu s kontinuálním záznamem.

## N Á R O K Y   N A   O C H R A N U

1. Mikrorespirograf s plynulou registrací spotřeby kyslíku a vylučování oxidu uhličitého buňkami a tkáněmi pracující na volumetrickém principu, obsahující elektronický převodník tlakových rozdílů mezi respirační a kompenzační nádobkou, přičemž elektronický převodník je napojen na tenzometrickou a respirační jednotku a respirační nádobka je opatřena generátorem kyslíku, vyznačené tím, že tenzometrická jednotka /11/ s elektronickým převodníkem /3/ je zpětnovazebně propojena s generátorem /10/ kyslíku přes regulační spínací obvod /12/ pro nastavení startu a rychlosti výroby kyslíku v závislosti na citlivosti měření.
  
2. Zařízení podle nároku 1 vyznačené tím, že elektronický převodník /3/ je tvořen polovodičovými tenzometry /15/ umístěnými na membráně /16/ o průměru 6 až 20 mm, tloušťce 0,01 až 0,08 rozdělující prostor elektronického převodníku na dvě stejné části, přičemž vnitřní prostor elektronického převodníku /3/ na každé straně membrány /16/ je v rozmezí 1 až 300  $\mu$ l a obě stejné části jsou spojeny věncem adjustačních šroubů /18/.

007398	00310	24. II. 93	ORAD	PŘEŠKOVÝ VLASTNÍ VÍ	PŘL.
--------	-------	------------	------	------------------------	------

