



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA ELEKTROTECHNIKY A KOMUNIKAČNÍCH TECHNOLOGIÍ

FACULTY OF ELECTRICAL ENGINEERING AND COMMUNICATION

ÚSTAV BIOMEDICÍNSKÉHO INŽENÝRSTVÍ

DEPARTMENT OF BIOMEDICAL ENGINEERING

MĚŘENÍ A REGULACE O₂ V ATMOSFÉŘE A V KAPALINĚ UVNITŘ BUNĚČNÝCH INKUBÁTORŮ

MEASUREMENT AND CONTROL OF O₂ IN THE ATMOSPHERE AND THE LIQUID WITHIN THE CELL
INCUBATORS

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Barbora Nečasová

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Jiří Sekora

BRNO 2017

Bakalářská práce

bakalářský studijní obor Biomedicínská technika a bioinformatika
Ústav biomedicínského inženýrství

Studentka: Barbora Nečasová

ID: 164985

Ročník: 3

Akademický rok: 2016/17

NÁZEV TÉMATU:

Měření a regulace O₂ v atmosféře a v kapalině uvnitř buněčných inkubátorů

POKYNY PRO VYPRACOVÁNÍ:

1) Seznamte se s elektrochemickými čidly pro měření atmosférického kyslíku. 2) Seznamte se s barvivý a mikrosenzory vhodnými pro detekci změn O₂ v kapalině. Vyhodnoťte kompatibilitu s kultivačními médii a typy buněk používanými v lab. biofyziky na ÚBMI. 3) Vypracujte přehled vhodnosti barviv a mikrosenzorů pro použití při detekci klasickým fluorescenčním mikroskopem případně konfokálním mikroskopem s laditelnými vlnovými délkami (excitace/emise). 4) Nastavte aparaturu pro dlouhodobé měření emise barviv a pravidelné time-lapse snímání misek pomocí citlivé kamery mikroskopu nebo detektoru na KM Leica. 5) Analyzujte přesnost měření O₂, diskutujte pozorované rušivé vlivy v průběhu 24hodinového měření v in-vitro miskách (pH media, uvolňování toxinů a organických látek buňkami). 6) Ověřte paralelním měřením koncentraci O₂ v atmosféře a v kultivačním mediu.

DOPORUČENÁ LITERATURA:

[1] Luminescent Sensing and Imaging of Oxygen: Fierce Competition to the Clark Electrode. O. S. Wolfbeis, Bioessays (2015) 3

[2] Ibdy : NanO₂ / MM2 - Intracellular O₂ Imaging. Nanoparticle reagents for the quantitative imaging of intracellular O₂ concentration [online]. 2011. Dostupný z: < <http://ibidi.com/>>."

Termín zadání: 6.2.2017

Termín odevzdání: 2.6.2017

Vedoucí práce: Ing. Jiří Sekora

Konzultant:

prof. Ing. Ivo Provazník, Ph.D.
předseda oborové rady

UPOZORNĚNÍ:

Autor bakalářské práce nesmí při vytváření bakalářské práce porušit autorská práva třetích osob, zejména nesmí zasahovat nedovoleným způsobem do cizích autorských práv osobnostních a musí si být plně vědom následků porušení ustanovení § 11 a následujících autorského zákona č. 121/2000 Sb., včetně možných trestněprávních důsledků vyplývajících z ustanovení části druhé, hlavy VI. díl 4 Trestního zákoníku č.40/2009 Sb.

ABSTRAKT

Tato bakalářská práce se zabývá měřením a regulací kyslíku v atmosféře a v kapalině uvnitř buněčných inkubátorů. Vychází ze stanovených požadavků a parametrů zadaných laboratoří biofyziky FEKT VUT. V teoretické části jsou popsány typy a principy senzorů. Hlavní část práce je zaměřena na návrh a následnou realizaci senzoru pro měření kyslíku pomocí mikrokontroléru.

KLÍČOVÁ SLOVA

Buněčný inkubátor, elektrochemické senzory, Clarkova elektroda, fluorescenční barviva, mikrokontrolér, Arduino

ABSTRACT

This bachelor thesis deals with the measurement and regulation of oxygen in the atmosphere and in liquid inside incubators for cell culture. It is based on specified requirements and parameters set by the Laboratory of the Biophysics of the Faculty of Electrical Engineering and Communication of BUT (FEKT VUT). In the theoretical part, types and principles of sensors are described. The theoretical part describes the types and principles of the sensors. The main part of the thesis is focused on the design and subsequent realization of oxygen sensor using a microcontroller.

KEYWORDS

Cell incubator, electrochemical sensors, Clark electrode, fluorescent dyes, microcontroller, Arduino

BIBLIOGRAFICKÁ CITACE

NEČASOVÁ, B. *Měření a regulace O₂ v atmosféře a v kapalině uvnitř buněčných inkubátorů: semestrální práce*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta elektrotechniky a komunikačních technologií, Ústav biomedicínského inženýrství, 2017. 46 s. Vedoucí práce Ing. Jiří Sekora.

Prohlášení

Prohlašuji, že svoji semestrální práci na téma „Měření a regulace O₂ v atmosféře a v kapalině uvnitř buněčných inkubátorů“ jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího semestrálního projektu a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce.

Jako autorka uvedené bakalářské práce dále prohlašuji, že v souvislosti s vytvořením této bakalářské práce jsem neporušila autorská práva třetích osob, zejména jsem nezasáhla nedovoleným způsobem do cizích autorských práv osobnostních a/nebo majetkových a jsem si plně vědoma následků porušení ustanovení §11 a následujících autorského zákona č.121/2000Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, včetně možných trestněprávních důsledků vyplývajících z ustanovení části druhé, hlavy VI. díl 4 Trestního zákoníku č.40/2009 Sb.

V Brně dne 2. května 2017

.....
Barbora Nečasová

Poděkování

Děkuji vedoucímu semestrální práce Ing. Jiřímu Sekorovi za cenné rady, věcné připomínky a vstřícnost při konzultacích a vypracování bakalářské práce. Dále bych také chtěla poděkovat Mgr. Josefu Skopalíkovi za odborné konzultace v oblasti biologie.

V Brně dne 2. května 2017

.....
Barbora Nečasová

OBSAH

SEZNAM OBRÁZKŮ	18
SEZNAM TABULEK	19
ÚVOD	10
1 PĚSTOVÁNÍ BUNĚČNÝCH KULTUR	11
1.1 Podmínky pro pěstování buněčných kultur	11
1.2 Buněčné inkubátory	11
2 SENZORY	13
2.1 Obecný senzor	13
2.2 Biosenzory	13
2.3 Rozdělení biosenzorů podle typu převodníku	14
2.3.1 Optické senzory	14
2.3.2 Akustické senzory	14
2.3.3 Termometrické-kalorimetrické senzory	14
2.3.4 Elektrochemické senzory	14
2.4 Elektrochemické senzory	15
2.4.1 Princip a složení elektrochemického senzoru	15
2.4.2 Základní parametry a požadavky na elektrochemické senzory	16
2.4.3 Rozdělení elektrochemických senzorů	17
2.4.4 Clarkova elektroda	19
2.5 Senzory na principu fluorescenčních barviv	20
2.5.1 Fluorescence	20
2.5.2 Obecný přehled fluorescenčních barviv (sond)	21
2.5.3 Vývoj a výzkum barviv (sond)	22
2.5.4 Aplikace a biologické využití	23
2.5.5 Barviva CPOx a MM2	24
3 VLASTNÍ NÁVRH ZAŘÍZENÍ	26
3.1 Blokové schéma detektoru kyslíku	26
3.2 Elektrické schéma zapojení	29
3.2.1 Elektrické schéma vstupní části	29
3.2.2 Elektrické schéma napájecí části	30
3.3 Řídící software detektoru kyslíku	31

3.3.1	Vývojový diagram programu.....	31
3.3.2	Softwarové řešení	33
4	DISKUZE	36
4.1	Změna zadaného detektoru kyslíku	36
4.2	Volba hardwaru.....	36
4.3	Kalibrace podle teploty okolí.....	37
5	ZÁVĚR	38
	LITERATURA	39
	PŘÍLOHY	44
	Celkové elektrické schéma zapojení	44
	Rozpiska součástek	45
	Kalibrační tabulka	46

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 2.1: Obecné schéma principu činnosti senzoru	13
Obrázek 2.2: Obecný princip biosenzoru	13
Obrázek 2.3: Obecné schéma elektrochemického senzoru	15
Obrázek 2.4: Redoxní reakce probíhající na elektrodách	16
Obrázek 2.5: Ukázka impedančního polymerního senzoru s interdigitální strukturou ..	17
Obrázek 2.6: V-A charakteristika a lineární proudově-koncentrační charakteristika.....	18
Obrázek 2.7: Schéma polarografu - základní součásti	19
Obrázek 2.8: Závislost proudu na napětí pro roztok obsahující ionty Cu^{2+} , Tl^{+} , Zn^{2+} .	19
Obrázek 2.9: Schéma Clarkovy elektrody - základní části	20
Obrázek 2.10: Schématické rozdělení jevů luminiscence	20
Obrázek 2.11: Spektra fluorescenční sond CPOx pro základní barvy	24
Obrázek 2.12: Spektrum fluorescenčního barviva MM2	25
Obrázek 3.1: Blokové schéma detektoru kyslíku	26
Obrázek 3.2: Vývojový kit mikrokontroléru Arduino Uno	28
Obrázek 3.3: Blokové schéma pro získání časových informací z PC	28
Obrázek 3.4: Elektrické schéma zapojení vstupní části	29
Obrázek 3.5: Elektrické schéma napájecí části	31
Obrázek 3.6: Vývojový diagram hlavního programu	34
Obrázek 3.7: Vývojový diagram kalibrace Clarkovy elektrody	35

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Vlastnosti porfyrinů Pt (II) a Pd (II).....	21
Tabulka 2: Vlastnosti barviv používaných pro měření kyslíku v kapalinách.....	22
Tabulka 3: Shrnutí aplikace a biologického využití extracelulárních sond	23

ÚVOD

Měření a regulace kyslíku v buněčných inkubátorech je jeden z nejdůležitějších faktorů pro udržování života a růstu (proliferaci) buněčných kultur. V případě kolísání koncentrace O_2 a s tím související koncentrace CO_2 , dochází k buněčné smrti. Tento proces je neobnovitelný.

Buněčné kultury dnes patří mezi základní techniky používané v klinické praxi a ve vědeckém výzkumu. Získávají se izolací buněk, jak živočišného, tak rostlinného původu. První kulturu izolovaných buněk označujeme jako primární kulturu neboli primokulturu. Po namnožení buněčných kultur se původní kultura rozdělí do nových kultivačních nádob. Tím získáme sekundární kulturu. Množení primárních kultur se používá v případě, že k danému pokusu potřebujeme větší množství buněk. Takto získáváme směs buněk, ze které oddělujeme požadované buňky. Nejjednodušší, i když ne zcela spolehlivou metodou, bývá použití kultivačních podmínek, které umožní růst pouze požadovaného buněčného typu

Mezi kultivační podmínky můžeme zařadit koncentraci O_2 v atmosféře a v kapalině, ve které se buňky kultivují. Měření lokálních koncentrací O_2 a gradientů ve tkáních a v buňkách je důležité pro oblast výzkumu, jako je metabolismus rakoviny, neuroscience, účinky hypoxie na buněčné fyziologie, biomedicínských přístrojů a hojení ran. Měření a regulaci koncentrace O_2 zajišťujeme pomocí jednoho či více senzorů.

Historie senzorů sahá do roku 1985, kdy C.R.Lowe předpokládal, že největší rozvoj senzorů bude využíván v oblasti zdravotnictví jako biosenzor pro účinnou péči o pacienta. Na začátku se uvažovalo o implantaci biosenzorů přímo do těla pacientů pro dávkování léků. Tento princip má uplatnění u diabetických pacientů dodnes. Prvním objevem byl polarografický biosenzor v roce 1922 J. Heyrovským. Pomocí polarografické metody byli vědci schopni měřit koncentraci kyslíku v biologických tekutinách a jejich spotřebu živými organizmy, tím vznikla rtuťová kapková elektroda. Významnou změnu v oblasti biosenzorů provedl v roce 1956 Leland C. Clark Jr., který pomoci vědeckého pokusu získal spolehlivý měřicí systém vedoucí k mnoha aplikacím a ke zrodu biosenzorů. Biosenzory byly díky uvedeným výzkumům od 20. století zařazeny do oboru každodenní péče o pacienta, jejich výzkum a vývoj pokračuje až do současnosti.

1 PĚSTOVÁNÍ BUNĚČNÝCH KULTUR

1.1 Podmínky pro pěstování buněčných kultur

Buněčná kultura je systém buněk, kdy jsou in vitro kultivovány prokaryotické, eukaryotické či rostlinné buňky za zvláštních specifických podmínek. Při dodržení specifických podmínek mají buněčné kultury velkou řadu využití. Živočišné kultury mají velký význam v genetice (např. klonování savců, mapování genomu a prenatalní vystření), imunologii (např. výroba monoklonálních protilátek) a mikrobiologii. Velmi často se využívají také ve výzkumu, kde slouží především jako zdroj materiálu. [35], [49]

K tomu, aby kultivované buňky in vitro přežily, je nutné zajistit vhodné podmínky. Mezi nejdůležitější podmínky můžeme zařadit povrch kultivační nádoby, složení kultivačního média a vlastnosti prostředí. Nejčastěji využívanou kultivační nádobou je polystyrénová nádoba s povrchovou hydrofilní úpravou. Kultivační médium podle skupenství a závislosti na použití dělíme na tuhá a kapalná. Teplota vhodná pro kultivaci buněk se uvádí, jako teplota blízká teplotě tělesné, tedy při 37 °C. Atmosféra v inkubační komoře obvykle obsahuje 5 % CO₂. Zvýšená koncentrace CO₂ se podílí na udržení konstantního pH, čímž zajistíme delší životnost buněčným kulturám. Relativní vlhkost atmosféry se udržuje kolem 90 %. [49], [9], [13], [11]

1.2 Buněčné inkubátory

Všechny výše uvedené vlastnosti prostředí zajišťují tzv. buněčné inkubátory neboli buněčné termostaty. Buněčný inkubátor pro udržení specifických podmínek využívá senzory k regulaci a měření teploty, pH, vlhkosti a koncentrace O₂ a CO₂. Kromě regulačního vybavení musí každý buněčný inkubátor umožňovat snadné čištění, dezinfekci a popřípadě i sterilizaci povrchů tak, aby nedošlo ke kontaminaci kultur bakteriemi či plísněmi. [13], [35], [49]

Ve vědecké oblasti i klinické praxi je používáno velké množství různých typů buněčných inkubátorů. Rozdělení buněčných inkubátorů podle cirkulace vzduchu:

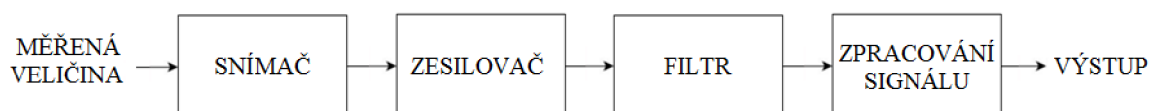
1. **Inkubátory s přirozenou cirkulací vzduchu** - Princip je založen na gravitačním proudění vzduchu v elektricky vyhřívané komoře buněčného inkubátoru. [17]
2. **Inkubátory s nucenou cirkulací vzduchu** - Princip činnosti je založen na proudění vzduchu pomocí ventilátoru, který zajišťuje vytvoření spirálovitě stoupajícího vzduchu uvnitř komory buněčného inkubátoru. Tento proces simuluje přírodní děje a zajišťuje optimální prohřívání buněčných kultur. Inkubátory s nucenou cirkulací mohou být modifikovány o přídavné chlazení a regulaci vlhkosti. [17]
3. **Inkubátory s nucenou cirkulací vzduchu** - Princip činnosti je založen na jemném gravitačním proudění pracovního plynu v elektricky vyhřívané komoře

při vysoké relativní vlhkosti. Tento systém nahrazuje práci ventilátoru, který může díky vibracím zapříčinit kontaminaci vzorku. Využívají se pro výzkum a v oblasti in vitro fertilizace. [17]

2 SENZORY

2.1 Obecný senzor

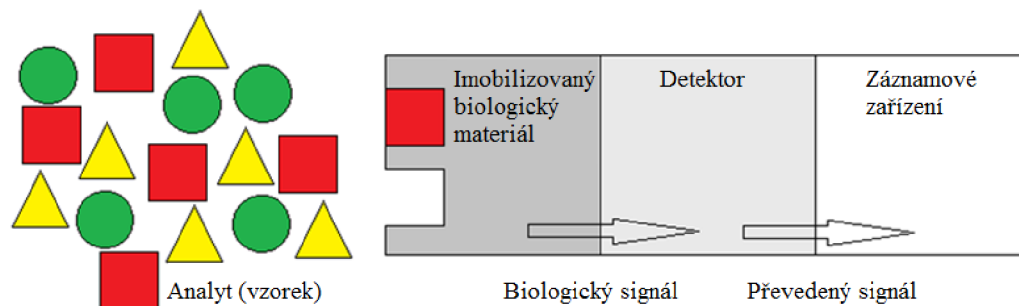
Senzor (ekvivalent pojmů detektor nebo snímač) je obecně definován jako zařízení určené k měření a snímání požadovaných informací fyzikálního, chemického či biologického charakteru. zdroj informací pro řídicí systém. Každý senzor je tvořen snímačem, zesilovačem, filtrem a z obvodů pro zpracování signálu. Obecné schéma senzoru je znázorněno na Obrázek 2.1. Senzor snímá měřenou veličinu, která je transformována na signál. Nejčastěji se jedná o signál elektrický. Signál je prostřednictvím zesilovače zesílen a filtrován. Takto upravený analogový signál je A/D převodníkem převeden na signál digitální. Další zpracování signálu provádí mikropočítač. [19], [38], [54]



Obrázek 2.1: Obecné schéma principu činnosti senzoru, upraveno a převzato z [38]

2.2 Biosenzory

Biosenzory jsou analytická zařízení, která jsou schopna detekce chemických nebo biologických látek či přítomnosti mikroorganismů. Každý biosenzor se skládá z biologického prvku (bioreceptoru) a převodníku. Citlivý biologický prvek udržuje přímý kontakt s fyzikálně chemickým převodníkem. Bioreceptory jsou látky, které rozpoznávají analytický cíl (tj. látka, která má být analyzována). Jako bioreceptor se v lékařství nejčastěji využívá enzymů, protilátek, bílkovin, apod. Důležitou součástí je také nosič bioreceptoru. Samotnou informaci nám pak poskytuje převodník, který analytický cíl převede na měřitelný signál. Nejčastěji se jedná o signál elektrický, ale může se jednat i o signál teplotní či optický, to je dáno typem biosenzoru. Takto převedený signál nám zajistí snadnější analýzu. Výstupem biosenzoru je elektrický signál, který je přímo úměrný koncentraci chemické látky ve vzorku. Na Obrázek 2.2 je schematicky znázorněn obecný princip biosenzoru. [8], [21], [40], [59], [64]



Obrázek 2.2: Obecný princip biosenzoru, upraveno a převzato z [63]

2.3 Rozdělení biosenzorů podle typu převodníku

2.3.1 Optické senzory

Optické senzory pracují na principu měření intenzity emitovaného světla dopadajícího na přijímací část senzoru nebo na principu změny indexu lomu, odpovídající výsledku biologické nebo chemické reakce. Ve zdravotnictví je můžeme využít pro stanovení dávky léčiva, k měření tělesné teploty pacienta, k detekci biologických látek apod. Výhodou optického senzoru je vysoká rozlišovací schopnost. [10], [19]

2.3.2 Akustické senzory

Tyto senzory jsou založeny na piezoelektrickém jevu. Piezoelektrický jev je schopnost krystalu generovat elektrické napětí při jejich deformaci. Jevem opačným je pak deformace krystalu v elektrickém poli. Zařízení tedy obsahuje piezoelektrický prvek, který při dané frekvenci osciluje. Jedná se o monokrystalický křemen jemně pokrytý zlatou vrstvou. Zlatá vrstva pak plní funkci elektrody. Na povrch elektrody je nanášena biologicky aktivní látka, která váže analyt v roztoku. Po navázání dojde ke zvýšení tuhosti systému a k úměrnému snížení rezonanční frekvence oscilace. Výhodou je možná miniaturizace zařízení a nízká cena, která má za následek malou specifitu, selektivitu a citlivost. Využití v lékařství nacházejí v diagnostických neinvazivních technologiích. [19], [53], [65]

2.3.3 Termometrické-kalorimetrické senzory

Termometrické biosenzory pracují na principu změny tepla v průběhu exotermických reakcí mezi analytem a biomolekulou imobilizovanou na teplotním senzoru. Pozorovanou změna entalpie systému lze nepřímo využít k detekci koncentrace analytu. Výhodou termometrických biosenzorů je snadná údržba přístroje nevyžadující časté kalibrace přístroje. Nevýhodou je, že jsou málo citlivé na optické a elektrochemické vlastnosti vzorku. Nejčastěji se využívají k analýzám v oblasti farmacie. [19]

2.3.4 Elektrochemické senzory

Elektrochemický senzor měří hodnotu koncentrace plynu a pomocí elektrochemického převodníku převádí neelektrickou veličinu na veličinu elektrickou. Výstupem analyzátoru je tedy informace ve formě elektrického signálu. Každý senzor musí být navržen tak, aby odpovídal požadavkům nutným k jeho provozu v daném prostředí. [18], [60], [56]

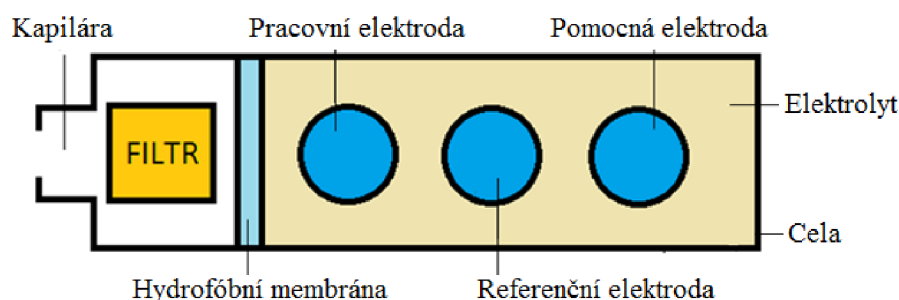
Protože se tento typ senzorů konkrétně týká zadání bakalářské práce je dále podrobněji popsán v kapitole 0.

2.4 Elektrochemické senzory

2.4.1 Princip a složení elektrochemického senzoru

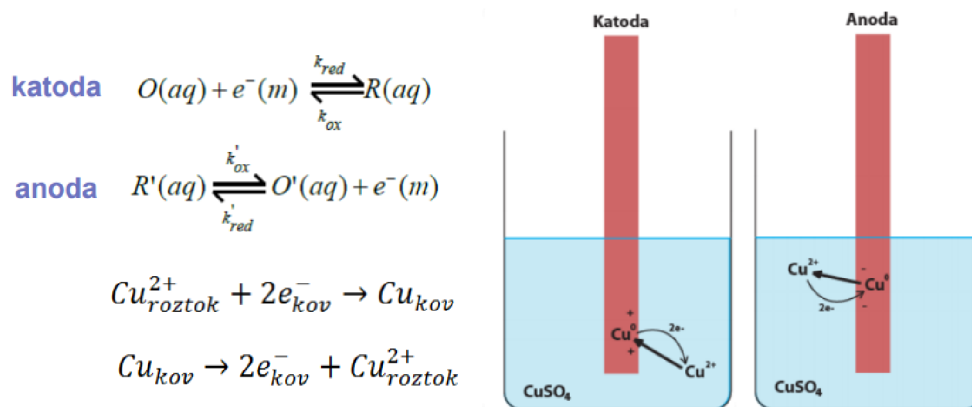
Princípem elektrochemických biosenzorů je měření elektrochemického signálu, který vzniká během biochemických interakcí mezi biologicky aktivní složkou a substrátem. [18]

Elektrochemický senzor se skládá z kapiláry, hydrofobní membrány, pracovní elektrody, referenční elektrody, pomocné elektrody, elektrolytu (pevný, kapalný) a ve zvláštních případech i filtru. Obecné schéma elektrochemického senzoru je znázorněno na Obrázek 2.3. Takový filtr slouží k odfiltrování nežádoucích částic a ke zlepšení selektivity celého senzoru. Tyto komponenty jsou uzavřeny do tzv. cely. [19], [22], [27]



Obrázek 2.3: Obecné schéma elektrochemického senzoru, převzato a upraveno z [22]

Plyn prochází přes kapiláru, jejíž funkcí je omezení množství přicházejícího plynu do snímače. Dále plyn difunduje přes hydrofobní membránu, tvořenou tzv. póry, které slouží jako sekundární filtr pro omezení množství plynu přicházející do kontaktu s povrchem pracovní elektrody. Díky své hydrofobní úpravě slouží membrána jako filtr k odstranění nežádoucích částic vody, které by mohly omezit funkčnost snímače. Velikost pórů tvořících hydrofobní membránu ovlivňuje důležité parametry senzoru. Větší póry zajistí vyšší citlivost senzoru, která je zajištěná přívodem většího množství plynu k povrchu pracovní elektrody za detekce menší změny plynu. Větší póry mají také svá úskalí, dochází především k rychlejšímu vysychání kapalného elektrolytu a tím se výrazně snižuje životnost celého senzoru. Pracovní a pomocná elektroda je oddělena elektrolytem, který slouží jako základ pro chemickou reakci na povrchu elektrod, umožňuje tedy tok iontů mezi elektrodami za vzniku elektrického signálu. Na povrchu pracovní elektrody dochází k redoxním reakcím, které jsou katalyzovány pomocnou elektrodou. Tyto reakce jsou popsány na Obrázek 2.4. Redoxní reakce jsou chemické reakce, při kterých dochází ke změně oxidačních čísel některých atomů prvků. Každá redoxní reakce je tvořena dvěma, které probíhají současně. Tyto dvě poloreakce nazýváme oxidace a redukce. Při oxidaci se oxidační číslo atomu prvků zvyšuje. Atom při oxidaci ztrácí elektrony, zatímco při redukcí se oxidační číslo prvku snižuje, dochází tedy k příjmu elektronů. Oxidační číslo určuje součet kladných a záporných iontů v atomu, čímž současně udává i polaritu iontu. Elektrochemická reakce je dána složením a skupenstvím elektrolytu, tvarem a materiálem elektrod, čímž udává základní parametry elektrochemického senzoru. [11], [19], [22]



Obrázek 2.4: Redoxní reakce probíhající na elektrodách, převzato z [19]

Pro elektrochemické reakce využíváme tyto druhy elektrod: [19]

- a) Vodíková elektroda
 - elektroda je ponořena do roztoku iontů svého druhu
 - přímá výměna iontů mezi elektrodou a roztokem
 - druhy elektrod: kovové nebo plynové (např. kationové, aniontové amalgámové)
- b) Referenční elektrody, iontově selektivní elektrody – tzv. ISE
 - jsou tvořeny kovem pokrytým vrstvou jeho málo rozpustné soli nebo hydroxidu
 - přímá výměna iontů mezi elektrodou a roztokem
 - druhy elektrod: kalomelová, argentchloridová, merkurosulfátová
- c) Pracovní polarizovatelné elektrody, vodivostní elektrody
 - materiál – ušlechtilé kovy (Au, Pt, Hg)
 - elektrody jsou nerozpustné v roztoku obsahující jak oxidovanou, tak redukovanou formu dané látky
 - výměna náboje probíhá prostřednictvím elektronu, jsou polarizovatelné

2.4.2 Základní parametry a požadavky na elektrochemické senzory

Z praktických důvodů jsou pro každý senzor důležité rozměry zařízení. U každého návrhu, se snažíme dosáhnout miniaturních, tento požadavek je však protichůdný z hlediska důležitých parametrů senzoru, proto je nutné volit kompromis. Každý senzor i biosenzor, musí splňovat základní požadavky:

1. Stabilita
2. Přesnost
3. Citlivost
4. Odolnost (přetížení, poškození)

Pro optimální práci senzoru je nutná úprava vzorku a volba vhodných pracovních podmínek prostředí (teplota a tlak, ...). Tyto pracovní podmínky jsou nutné k tomu, aby

nedocházelo k příliš velkým odchylkám měření nebo k přímé degradaci vzorku. [19], [39]

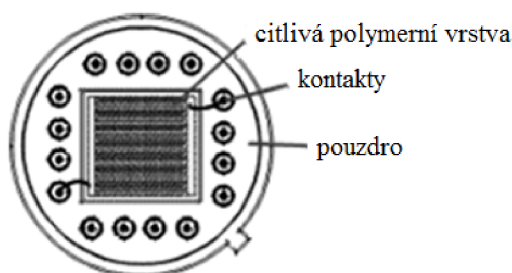
2.4.3 Rozdělení elektrochemických senzorů

Teplotní senzory

Teplotní senzory jsou nejčastěji založeny na vzniku tepelného efektu na fázovém rozhraní kapalina/tuhá fáze nebo plyn/tuhá fáze. Plyn nebo kapalina jsou analyzovaným vzorkem a tuhá fáze je teplotním senzorem, jehož povrch je vhodným způsobem upraven látkou (katalyzátorem) umožňující reakci analyzované složky vzorku a reagentie, která se ke vzorku v dostatečném množství přidává. Možné je také uspořádání, kdy látka nanesená na povrch teplotního senzoru přímo reaguje s analytem v plynné nebo kapalné fázi za vzniku tepelného efektu. [39]

Impedanční/vodivostní senzory

Princip impedančních/vodivostních senzorů spočívá v měření elektrické vodivosti nebo odporu roztoku v závislosti na koncentraci analytu. Biochemická reakce probíhá mezi biologickou aktivní látkou a analytem. Impedanční senzor využívá interdigitální strukturu elektrod. Ukázka interdigitální struktury je na Obrázek 2.5. Vhodným materiálem pro tento typ elektrod je např. polyetheruretan, který lze využít pro detekci etanolu. [19]



Obrázek 2.5: Ukázka impedančního polymerního senzoru s interdigitální strukturou, převzato z [19]

Využívají stejnosměrné nebo střídavé metody:

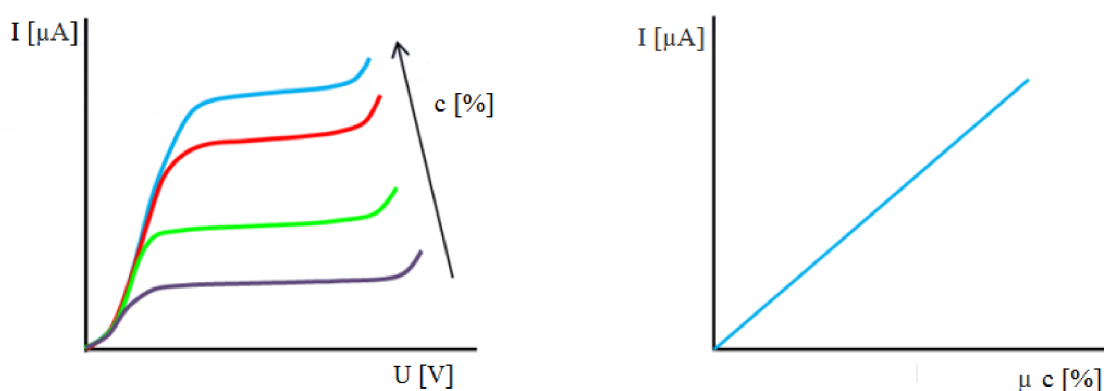
- Stejnoseměrná metoda – Konduktometrické senzory – lze stanovit pouze odpor.
- Střídavá metoda – Impedimetrické senzory – lze stanovit až 4 parametry (modul, fáze, reálná a imaginární část).

Potenciometrické senzory a pH senzory

Základní princip potenciometrických senzorů a pH senzorů je založen na zjišťování potenciálu fázového rozhraní vznikajícího mezi kovem a roztokem. K měření využívají iontově selektivních elektrody. Do tohoto typu senzorů zařazujeme amperometrické senzory a senzory iontově selektivní. [39], [68]

Princip amperometrického senzoru je založen na měření proudu vznikajícího při vložení stejnosměrného napětí mezi dvě elektrody ponořené v elektrolytu. Jedna elektroda je označována jako katoda, slouží jako pracovní. Je tvořena vzácným kovem

nebo tištěnou vrstvou pokrytou biologicky aktivní látkou. Druhá elektroda anoda je platinová nebo stříbrná. Napětí na katodě se pak nastavuje vzhledem k elektrodě vztažné. Ponoříme-li elektrody do roztoku obsahující analyzovanou látku, dojde k vytvoření chemické reakce na rozhraní roztoku a katody. Po přiložení stejnosměrného napětí dochází k polarizaci měřicí elektrody a obvodem prakticky neprotéká proud. Při zvětšování napětí se po překonání energetické bariéry mezi elektrodou a roztokem začne projevovat difúze částic depolarizátoru a vzniká difúzní vrstva s proměnným gradientem koncentrace. Proud obvodem pak narůstá. Při určitém napětí na VA charakteristice (na Obrázek 2.6) proud vykazuje skoro konstantní hodnotu i při rostoucím napětí. Hodnota proudu je úměrná koncentraci kyslíku. [38], [68]



Obrázek 2.6: V-A charakteristika a lineární proudově-koncentrační charakteristika, převzato z [19]

Iontově selektivní senzory jsou založeny na principu měření potenciálu mezi dvěma elektrodami. A to elektrodou pomocnou a referenční, jejíž potenciál nezávisí na koncentraci analyzovaných iontů. Třetí elektroda je měrná, jejíž potenciál závisí na koncentraci podle Nernstovy rovnice:

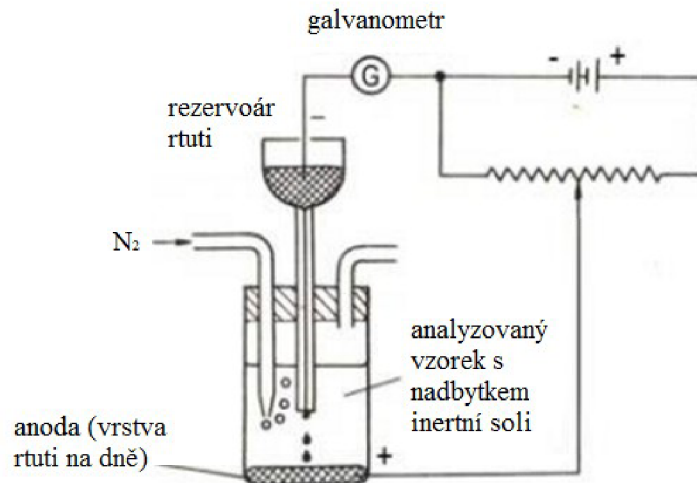
$$E = E^f - \frac{0,0592}{z} \log c \quad (1)$$

kde $E [V]$ je potenciál měrné elektrody, $E^f [V]$ je formální potenciál elektrody, který je zpravidla konstantní, $z [-]$ je nábojové číslo analyzovaného iontu a $c [mol/l]$ jeho koncentrace v roztoku. [39]

Je-li elektroda citlivá na kationty, pak s rostoucí koncentrací roste i její potenciál a naopak, je-li citlivá na anionty, pak s rostoucí koncentrací její potenciál klesá. Nenabitě neutrální molekuly nelze určit. [39]

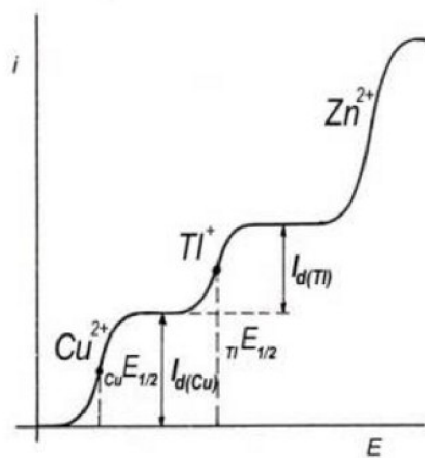
Polarografické senzory

Polarografický princip spočívá ve vyhodnocování závislosti elektrického proudu na napětí přivedeném na dvojici elektrod (anoda a katoda) ponořených v elektrolytu. První elektroda je tzv. pracovní - katoda, slouží jako rtuťová kapající elektroda, kterou představují neustále se tvořící a odkapávající kapičky rtuti. Vrstva rtuti na dně nádoby může sloužit jako referenční elektroda a představuje současně anodu. Schéma základních částí polarografu můžeme vidět na Obrázek 2.7. [28], [66]



Obrázek 2.7: Schéma polarografu - základní součásti, převzato z [66]

Při zvýšení potenciálu mezi elektrodami dochází ke zvýšení proudu. Proud je omezen počtem iontů v roztoku. Závislosti mají tvar vln Obrázek 2.8. Část křivky, která odpovídá vzestupu proudu z jedné její vodorovné prodlevy na druhou, se nazývá polarografická vlna. Stanovení půlnového potenciálu slouží k identifikaci redukovaného iontu. Hodnota limitního proudu řízeného difúzí je pro každý ion úměrná jeho koncentraci. [28], [66]

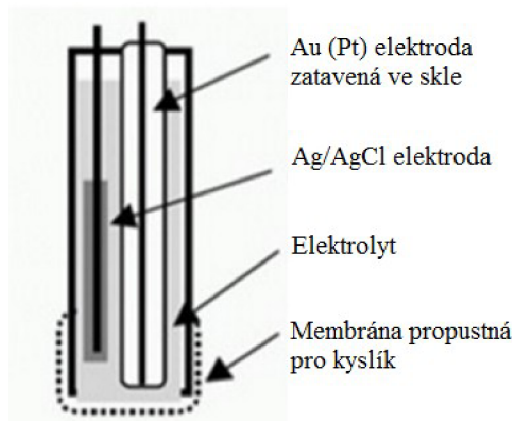


Obrázek 2.8: Závislost proudu na napětí pro roztok obsahující ionty Cu^{2+} , Tl^+ , Zn^{2+} , [66]

2.4.4 Clarkova elektroda

Na principu polarografie je založena Clarkova elektroda znázorněna na Obrázek 2.9, která slouží ke stanovení množství kyslíku. Clarkova elektroda je tvořena platinovým drátkem (Pt), který je zataven ve skle, anoda je tvořena argenticchloridovým drátkem (Ag/AgCl), který je potažen velmi tenkým filmem elektrolytu a ponořena do fosfátového pufru. Mezi elektrodami je vloženo napětí odpovídající půlnovému potenciálu $-0,63$ V. Pokud je v testovaném vzorku přítomen kyslík, dochází k jeho difúzi ze vzorku přes membránu do fosfátového pufru a tím dochází ke zvýšení intenzity proudu. Intenzita proudu je následně redukována na katodě a její množství

odpovídá pO_2 (parciální tlak kyslíku). V případě, že kyslík v testovaném vzorku obsažen není, proud neprotéká. [7], [66]



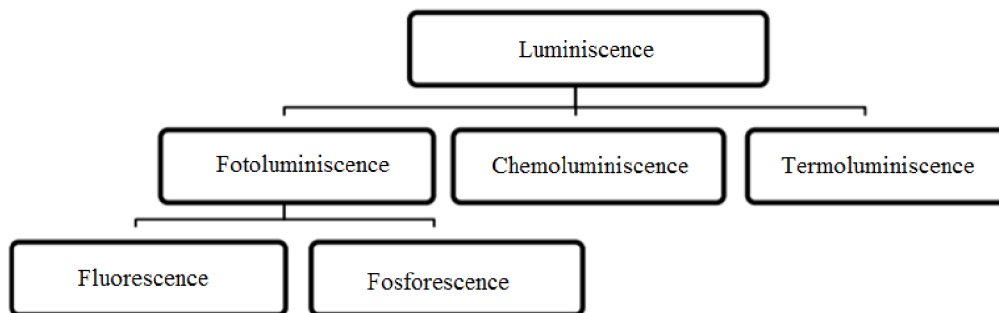
Obrázek 2.9: Schéma Clarkovy elektrody - základní části, upraveno a převzato z [7]

Před použitím Clarkovy elektrody je nutná kalibrace elektrod. Kalibraci provádíme z důvodů procesů stárnutí membrány a pasivaci obou elektrod, tyto vlivy by bez kalibrace mohly ovlivňovat přesnost měření. Používá se jednobodová či vícebodová kalibrace. V případě, že zvolíme dvoubodovou kalibraci, pak odezva měrné elektrody odpovídá lineárnímu průběhu a můžeme hovořit o přesném měření kyslíku v rozmezí 0 % až 100 % s minimální odchylkou měření. Výhodou Clarkovy elektrody je delší životnost ve srovnání s běžnými elektrochemickými analyzátoři. Omezit její životnost je možné mechanickým poškozením nebo zaschnutím polypropylenové membrány – nezvratný stav. Nevýhodou oproti galvanické kyslíkové sondě je, že vyžadují vlastní převodník nebo oxymetr, stavěný na konkrétní typ čidla od konkrétního výrobce. [7]

2.5 Senzory na principu fluorescenčních barviv

2.5.1 Fluorescence

Fluorescence je fyzikálně-chemický jev, který řadíme do kategorie luminiscenčních jevů. Tento jev vzniká excitací atomu (přechodem do stavu s vyšší energií) působením jiného záření a následným návratem atomu do základního stavu. Luminiscenci lze rozdělit podle jevu, kterým se projevuje právě při návratu atomu do rovnovážného stavu. Rozdělení jevů je na Obrázek 2.10. [1], [42], [53]



Obrázek 2.10: Schématické rozdělení jevů luminiscence, převzato z [51]

Jev fotoluminiscence, se projevuje zářením dané látky. Jedná se o látky, které jsou schopny absorbovat kvanta záření o určitém množství energie. Tím se látka dostává do tzv. excitovaného stavu. Excitovaný stav je stav, kdy má látka vyšší energii než je jeho základní (klidová) energie. Po excitaci se látka snaží dostat zpět z vyšších energetických tříd do rovnovážného stavu, k tomu dochází pomocí zářivému přechodu. Zářivým přechodem dochází k emisi světelného kvanta do okolí. V případě, že by docházelo k tzv. nezářivému přechodu, pak mluvíme o chemiluminiscenci či termoluminiscenci. [1], [51], [53]

Fotoluminiscenční záření má konečnou dobu trvání. Podle doby trvání záření fotoluminiscenci rozdělujeme na: na fluorescenci a fosforescenci. Fluorescence je záření, u kterého dochází k dohasnutí ihned (řádově v nanosekundách) po odstranění zdroje excitace. Pokud záření přetrvává i po odstranění zdroje, jev se nazývá fosforescence. [1], [51], [53]

2.5.2 Obecný přehled fluorescenčních barviv (sond)

Fosforeskující Pt (II) - a Pd (II) – porfyriny

Tato barviva patří mezi nejvíce využívané k měření kyslíku v kapalinách. Následující

Tabulka 1 uvádí základní rozdíly mezi porfyrinovými barvivami.

Tabulka 1: Vlastnosti porfyrinů Pt (II) a Pd (II) [6], [45], [48], [55], [62]

Typ barviva	Pt (II) porfyriny	Pd (II) porfyriny
Doba záření – fosforescence [ms]	40 – 100	400 – 1000
Rozsah měření O ₂ [μM]	0 – 200	< 50
Absorpční pásmo UV [nm]	370 – 410	370 – 410
Absorpční viditelné pásmo [nm]	500 – 550	500 – 550
Emise [nm]	630 – 700	630 – 700

Některá porfyrinová barviva mají posunuté budící pásmo od 590 nm až 650 nm při záření 730 nm až 900 nm a větší jas, tyto barviva označujeme jako longwave. Porfyrinové barviva (např. Photofrin a chloriny) při měření kyslíku v extracelulárním i intracelulárním prostředí nevykazují při standardních podmínkách fototoxický účinek. Můžeme jim tedy přiřadit vlastnost fotosenzitivity. [6], [30], [45], [48], [58], [62]

Ru (II) komplex

Další významnou kategorií barviv pro měření kyslíku v kapalinách je fosforeskující Ru (II) komplex. Jedná se kationové barviva, jejíž vlastností je výborná fotostabilita a nižší úroveň jasu (nižší než u porfyrinů). Nevýhodou je však nižší životnost fosforescence 1-5 ms. Tato nevýhoda má za následek nižší citlivost a vyšší rychlost detekce kyslíku v kapalině. [25], [48]

Cyclometallated komplexy Ir (III)

Cyclometallated komplexy Ir (III) vykazují vysoký jas a střední životnost, ve srovnání s PT-porfyrinu a Ru (II) barviv. Nevýhodou je nízká fotostabilita, která omezuje jejich použití pro zobrazovací systémy kyslíku. [5], [71]

Souhrn vlastností nejčastěji využívaných barviv pro měření kyslíku v kapalinách jsou uvedeny v Tabulka 2.

Tabulka 2: Vlastnosti barviv používaných pro měření kyslíku v kapalinách [30], [48]

Indikátor (barvivo)	Excitace [nm]	Emise [nm]	Životnost fosforescence (μs)
PdTPCPP	415 – 524	690	~ 800
PdTCPTBP	442 – 631	790	240
PtCP	380 – 535	650	~ 60
PtTBP	416 – 609	745	50
PtCPK	400 – 596	767	24
Ir(III)(C _x) ₂ (acac)	472 – 444	563	11,3

2.5.3 Vývoj a výzkum barviv (sond)

V rámci měření kyslíku v kapalinách, lze definovat několik kategorií sond (barviv).

Ve vodě rozpustné PdTPCPP, Ru (II) barviva a sloučeniny PtCP, obsahující hydrofilní barvivo struktury. Nevýhodou sondy je náklonnost k nespecifické vazbě na proteiny buněk a migrovat v rámci vzorku. Vykazují nižší citlivost na složení vzorku (pH, iontová síla a obsah proteinu). Tyto problémy lze řešit konjugací s citlivým barvivem. Z této kategorie se nejčastěji využívá sonda MitoXpress, využívá se v respirometrických screeningových testech u izolovaných mitochondrií a pro malé organismy. [23], [29], [32], [41], [57]

Další sondy jsou vyvinuty skupinou Vinogradov pro zobrazování tkání a cév. Jedná se o sondu tvořenou meso-substituovaných Pd / Pt-porfyrinu upravených pomocí čtyř karboxylových skupin s dendritickými polyglutamovými řetězci. Tyto sondy byly vyrobeny s vlnovou délkou 400 – 700 nm a emisí vlnové délky od červené do blízké infračervené oblasti. Vykazují odlišnou citlivost. Jejich specifické využití je stále ve vývoji. [20], [43]

Další skupinou molekulárních sond jsou konjugáty barviv fosforeskující s peptidy, pro snímání intracelulárního kyslíku. V tomto případě je luminiscenční část [a Ru (II), barvivo nebo Pt-coproporphyrin (PtCP)] je připojena přímo k polyargininu nebo prolinu. Tyto látky jsou bohaté na peptidy. Konjugace zlepšuje funkční vlastnosti sondy s možností snímání intracelulárního kyslíku a umožňuje jednoduchou analýzu buněčných populací na komerčním fluorescenční čtečky. Nevýhodou je nízká fotostabilita, která zapříčiní nemožnost zobrazování měřeného kyslíku. V budoucnu by muselo dojít k úpravě využívaných barviv s vyšší fotostabilitou. [15], [16], [17], [24]

Další skupinou jsou sondy na mikro a nanočástic. Sonda je kovalentní nebo nekovalentní vazbou zabudována do barviva. Sonda se zhotovuje impregnací polymerů

(např. polystyrén) se začleněním barviva a tvorba jádra s obalem metodou srážení. Tato skupina kyslíkových sond je nyní pod aktivním vývojem. Výhodou těchto sond je vysoké jasové rozlišení, fotostabilita. Nevýhodou je toxicita pro aplikace in vivo. [36], [37], [46]

Endogenní O₂ citlivé sondy se skládají z fotoluminiscenční struktur, které jsou kódovány geneticky. V dnešní době byly využity k zobrazování respirační aktivity buněk poměrové analýzy fluorescenčního donorů elektronů a redoxních indikátorů NADH a FAD. Výhodou je, že tyto ukazatele jsou přítomny ve všech buněčných liniích. Nevýhodou je nízká kvantová výtěžnost fluorescence, která se pohybuje v hodnotě menší než 1 %, proto aplikace vyžaduje intenzivní osvětlení vzorku. Tyto sondy byly také různě modifikovány (např. protoporfirinem) a prověřeny pro měření kyslíku u izolovaných hepatocytů a in vivo kardiocytů. Výsledky této modifikaci byly stejné jako u předchozí varinaty. Mimo jiné se vyskytovala i poměrně nízká fotostabilita a fotosenzibilita zapříčiněná přítomností protoporfínu. [69], [72]

2.5.4 Aplikace a biologické využití

Pro mapování kyslíku v živé tkáni se využívají extracelulární sondy, které injikujeme přímo do krevního oběhu nebo tkáně. Sonda při pokusu in vivo zůstane v cévách bez proniknutí do buněk a vykazuje nízkou toxicitu pro některé orgány, jako jsou např. ledviny či játra. Pro měření míry spotřeby kyslíku a souvisejících in vitro aplikací s kultivovanými buňkami se využívají extracelulární sondy rozpuštěné v médiu. Přehled aplikací a biologického využití obsahuje Tabulka 3. [26], [31], [45]

Tabulka 3: Shrnutí aplikace a biologického využití extracelulárních sond [26], [31], [45]

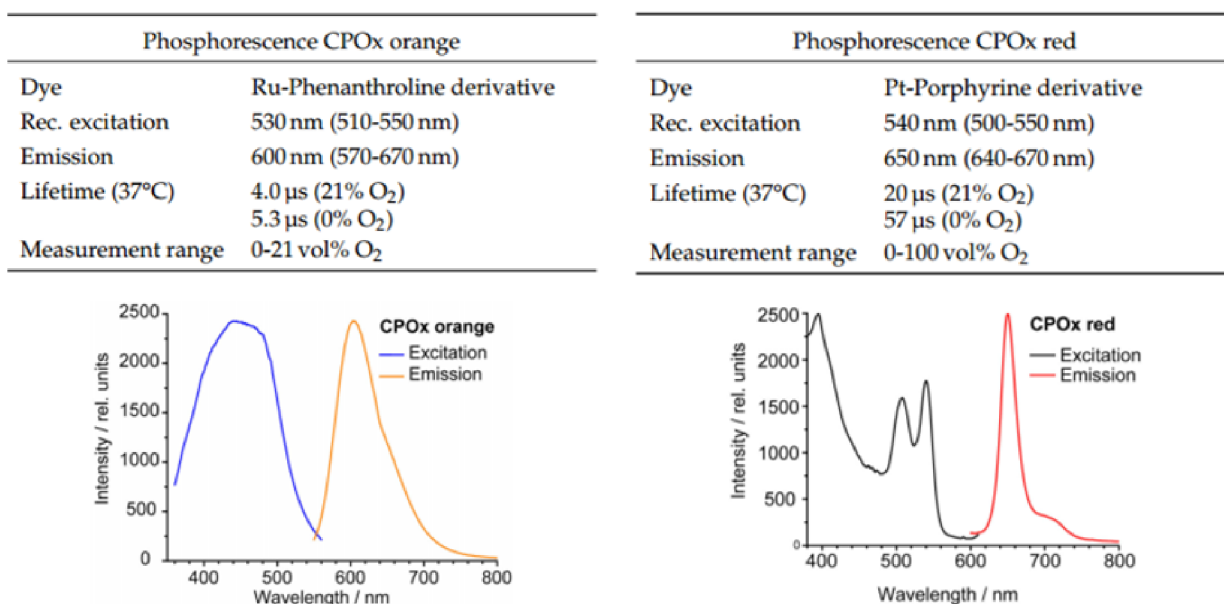
Název a typ sondy	Aplikace a využití sondy	Excitace	Emise
PdTPCPP	Mapování kyslíku v živých tkáních – cévy a kapiláry	416 nm až 523 nm	690 nm
Oxyphor R2 (PdTPCPP dendrimer SM)	Mapování kyslíku v živých tkáních – cévy a kapiláry	524 nm	690 nm
MitoXpress (PtCP conjugate)	Míra spotřeby kyslíku buňkami, mitochondrie, vyhodnocené buněčné energetiky. Sonda přídavná.	340 nm až 420 nm	640 nm až 660 nm
PTP-C343 (PtTAOP-Kumarin 343 dendrimer) SM	Mapování kyslíku v živých tkáních – cévy a kapiláry	840 nm	682 nm
Oxyphors R4 a G4	Tkáňové přechody kyslíku in vivo, mapování nádorů, krevní a cévní sonda, sonda pro intersticiální prostor.	428 nm až 530 nm	698 nm (R4) a 813 (G4)
PS-NP (polystyren NP dotován	Mapování kyslíku v nádorech	635 nm	670 nm

2.5.5 Barviva CPOx a MM2

Pro účely měření změn koncentrace kyslíku v kapalinách můžeme v podmínkách laboratoře biofyziky na UBMI využít tyto typy barviv: CPOx a MM2. Obě tato barviva jsou ve formě velmi malých fluorescenčních kuliček, které slouží jako sondy. Tyto sondy jsou citlivé na elektrický signál (potenciál) vznikající v buněčných kulturách, který vzniká v důsledku nerovnováhy koncentrace kyslíku v intracelulárním a extracelulárním prostoru. Na základě měnícího se signálu (potenciálu) jsou schopny změnit svoji spektrální charakteristiku a tím podávají optickou informaci do svého okolí. Detekce změn spektrálních charakteristik se provádí pomocí fluorescenčního mikroskopu nebo pomocí optického měřicího systému Ibidi OPAL. Systém slouží jako optoelektronický hardware a software pro generování a zpracování fluorescence životnosti signálů kyslíku. Měření můžeme provést buďto v buněčné kultuře či přímo na tkáni. [33], [34]

Fluorescenční barvivo CPOx

Fluorescenčními sondy obsahující barvivo CPOx ve formě nanokuliček jsme schopni monitorovat změny extracelulární koncentrace kyslíku v živých eukaryotických buňkách a tkáních. Skládají se z biokompatibilní latexové matice, která obsahuje sensorové barvivo a fotografické stabilizátory, které zabrání snížení intenzity (blednutí). Sondy jsou k dispozici ve dvou standardních barvách oranžové a emisní červené. Jejich spektra můžeme vidět na Obrázek 2.11. [33]



Obrázek 2.11: Spektra fluorescenční sond CPOx pro základní barvy, převzato z [33]

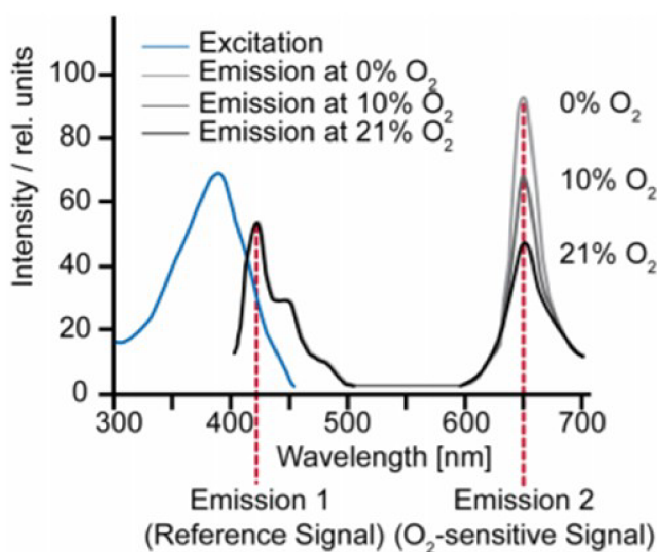
Skladování sond je možné při teplotě 2 °C až 8 °C, bez přímého slunečního záření a mimo jasné světelné zdroje. Světelným zdrojem rozumíme UV záření a ultrafialové světlo. Krátkodobé umístění na světlo vliv nemá, delší expozice by mohla způsobit snížení intenzity nebo posun kalibrační křivky. Vyhnout bychom se měli i skladování s přímým kontaktem s nepolárními rozpouštědly (aceton, cyklohexan, toluen, chloroform) a lepidel na bázi polyakrylátů, tyto látky způsobují narušení

fotostabilizátorů. Ohřev je možný do teploty 125 °C, vyšší teplota zapříčiní shluky nanokuliček. [33]

Monitorování extracelulárního kyslíku pomocí sond provádíme v buněčných kulturách ve vodných roztocích. Před aplikací rozvíříme vodný roztok buněčné kultury a tím dosáhneme rovnoměrné distribuce sond. Při použití v kultivačních miskách aplikujeme sondy přímo k buňkám. Aplikaci provádíme vždy pomocí pipety, kterou lze zajistit sterilní podmínky prostředí. Před použitím je vždy nutné provést kalibraci. Standardní rozsah měření při splnění podmínek prostředí je 0 % až 100 % pO₂, což odpovídá 0 - 1 mmol / l O₂. Přesnost měření je ± 1 % na 100 % vzduchu nasycení (což odpovídá 21 % objemu O₂). Doba odezvy v řádech sekund. Pomocí této sondy jsme schopni sledovat změny koncentrace kyslíku „lifetime“ rychlost je dána procentuálním zastoupením kyslíku a to např. 4,0 μs pro 21 % O₂ a 5,3 μs pro 0 % O₂. [33]

Fluorescenční barvivo MM2

Fluorescenční sondy obsahující barvivo MM2 je stejně jako předchozí CPOx ve formě nanokuliček, stejně tak slouží k monitorování extracelulární koncentrace kyslíku v živých eukaryotických buňkách a tkáních. Výhodou tohoto barviva je možnost měřit i intracelulární oksyločení buněk. U kvantifikační detekce kyslíku využíváme častěji fluorescenční mikroskop v základním vybavení. Pod mikroskopem jsme schopni měřit změny koncentrace v reálném čase „lifetime“. Nanokuličky jsou dostupné ve standardní emisní červené barvě. Spektrum můžeme vidět na Obrázek 2.12. [34]



Obrázek 2.12: Spektrum fluorescenčního barviva MM2, převzato z [34]

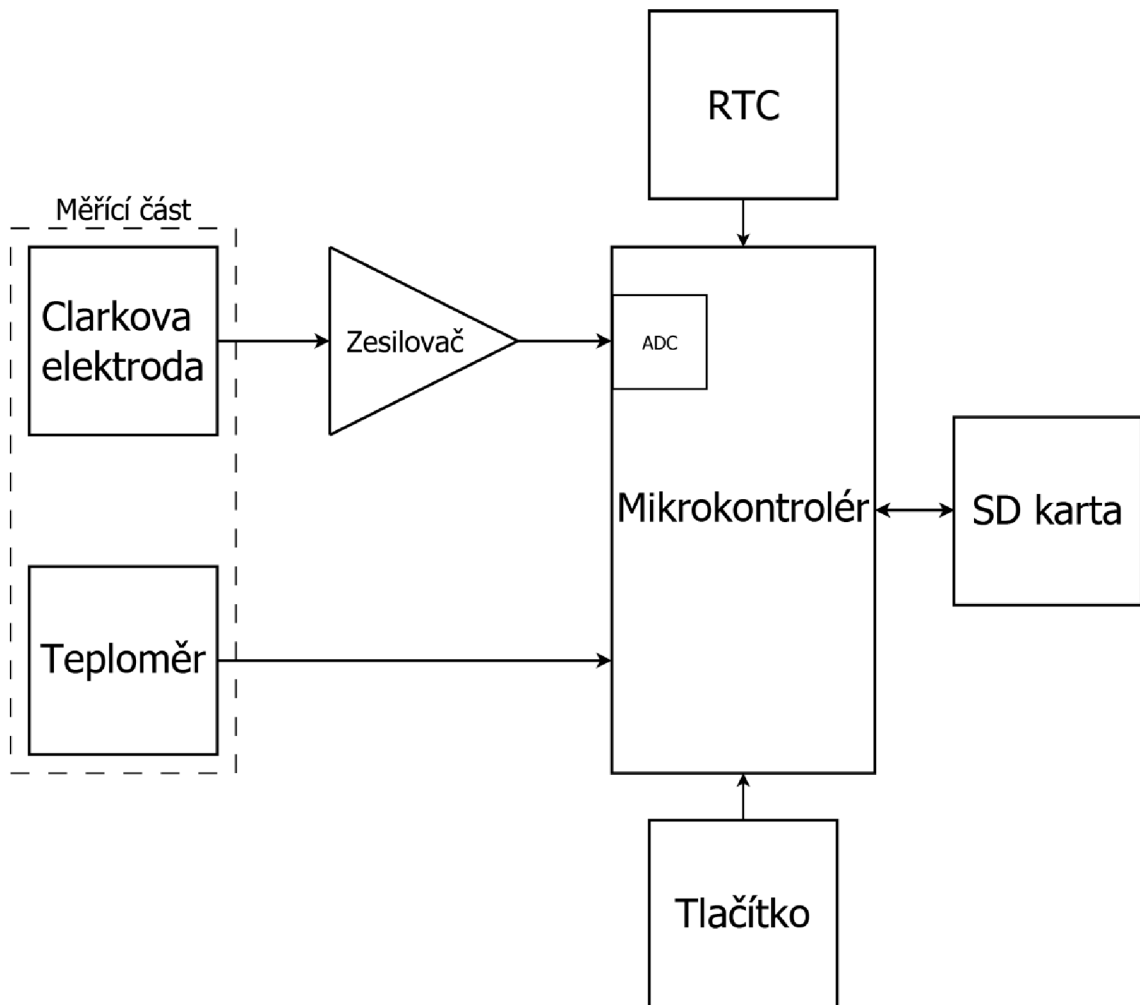
Skladování nanokuliček je obdobné jako u barviva CPOx, výjimkou je teplota skladování a to 4 °C, tato teplota je omezena právě vysokou citlivostí barviva na teplotní změny. Nutností je skladování mimo přímý zdroj světla, skladujeme nejlépe v temném prostředí. Při nedodržení skladovacích podmínek může dojít k necitlivosti sondy, která se projeví pouze velmi krátkým expozičním časem. Doba použitelnosti je obvykle 1-2 týdny pro 1 mg/ml zásobního roztoku. [34]

3 VLASTNÍ NÁVRH ZAŘÍZENÍ

Při návrhu zařízení bylo nutné brát ohled na potřeby buněčných kultur. Především na prostředí, ve kterém jsou schopny buňky kultivace. Od toho vznikly požadavky na zařízení, kterými jsou variabilita vstupních parametrů, rozsah měření koncentrace 0 % až 100 %, měření v kapalině a logování do čitelného nebinárního formátu. Pro splnění požadavku variability vstupních parametrů (interval měření a počet měření) je v návrhu zařízení zařazeno čtení z konfiguračního souboru na SD kartě. Měření v kapalině v rozsahu koncentrace 0 % až 100 % je splněno vhodně zvolenou Clarkovou elektrodou, která byla vyrobena podle individuálních požadavků na zakázku od firmy Theta 90. Poslední požadavek logování výstupních hodnot (čas, datum měření, koncentrace kyslíku) je splněno zápisem na SD kartu do vhodného nebinárního formátu „csv“.

3.1 Blokové schéma detektoru kyslíku

Na Obrázek 3.1 je graficky znázorněno blokové schéma detektoru kyslíku.



Obrázek 3.1: Blokové schéma detektoru kyslíku

Měřicí část představuje nádoba s roztokem, ve které probíhá kultivace buněčných kultur. K zajištění životně důležité podmínky udržovat správnou koncentraci kyslíku v prostředí buněčného inkubátoru slouží Clarkova elektroda, měřící napětíovou změnu. Výstupní signál (změnu napětí) je nutné následně zesílit zesilovačem, aby mohl být přiveden na 10bitový AD převodník, který je integrován v jednotce mikrokontroléru (v našem případě se jedná o mikrokontrolér Arduino Uno). Software mikrokontroléru zapíše aktuální časovou informaci do RTC modulu a provede instrukce podle vstupních veličin (interval měření a počet měření) zadaných uživatelem pomocí slotu pro SD kartu. SD karta zároveň slouží po uložení a archivaci všech naměřených hodnot. Přidané tlačítko slouží pro komunikaci mezi mikrokontrolérem a uživatelem v okamžiku měření kalibračních hodnot elektrody.

Blok Clarkova elektroda

Pro účel našeho měření byla vybrána atypická kyslíková sonda typu OC-233 o délce 30 mm. Skládá se ze dvou částí: čidla a membránového modulu s FEP fóliovou membránou. Z čidla sondy je vyveden kabel pro připojení sondy ke stabilizovanému zdroji napětí 600 – 700 mV. Po připojení naplněné sondy ke zdroji napětí a ustálení (polarizaci) je proud sondy cca 5 – 10 nA ve vodě nasycené vzduchem při 25 °C. Reakční rychlost elektrody je do 30s, při pracovní teplotě 0 – 50 °C. Jako pracovní elektroda je použit platinový terčik - katoda a jako anoda je použita referenční Ag/AgCl elektroda stíněna koaxiálním kabelem. [61]

Blok zesilovač

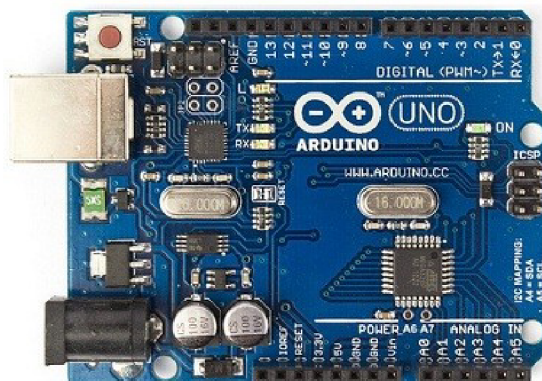
Pro zesílení výstupního signálu z Clarkovy elektrody využijeme operačního zesilovače zapojeného jako rozdílový. Jedná se o aktivní prvek s nekonečně velkou hodnotou zesílení, nekonečnou vstupní impedanci a nulovou výstupní impedanci. Z elektrické podstaty se jedná o stejnosměrný zesilovač s nekonečně velkým vstupním odporem a velmi malým šumem. [14], [67]

Blok mikrokontrolér

Byla zvolena platforma Arduino, model Uno od firmy Atmel. Arduino Uno (Obrázek 3.2) je 8bitový mikrokontrolér s Harvardskou architekturou. Obsahuje výkonný mikroprocesor ATmega 328P o frekvenci 20 MHz. Obvykle je napájen 5 V zdrojem napětí, připojený pomocí USB konektoru. Velikost datové RAM paměti je 2 kB, velikost programovací paměti EEPROM je 1 kB. Skládá se z 14 digitálních vstupně-výstupních portů, zahrnujících 1 hardwarový sériový port a 6 pulzně šířkových pinů a I2C rozhraní. Dále ještě 16 výstupních analogových pinů. Součástí základní desky je 10bitový ADC převodník. Tato platforma vyhovuje požadavkům návrhu. [3], [44]

Blok teploměr HS18S20

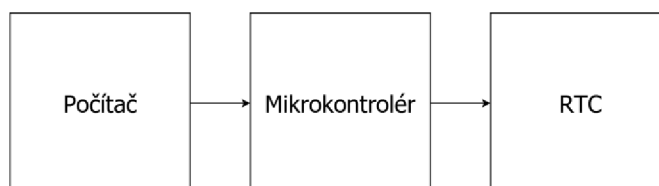
Tento blok slouží pro měření teploty, která je nutná pro kalibraci Clarkovy elektrody (viz kalibrační tabulka v příloze). Jedná se o provedení čidla pro měření v kapalině. Čidlo je kalibrováno s přesností až 0,05 °C. Měří v rozsahu hodnot -55 °C - 125 °C. Digitální čidlo vrací teplotu přímo hodnotou, není nutný její přepočítání. [12]



Obrázek 3.2: Vývojový kit mikrokontroléru Arduino Uno, převzato z [3]

Blok RTC

Integrovaný obvod hodin reálného času slouží k přesnému sledování předem nastaveného času z počítače. Blokové schéma můžeme vidět na Obrázek 3.3. Modul je k Arduinou připojen sběrnici I2C. Jedná se o modul od výrobce Tronixlabs, který má vestavěnou baterii. Nevýhodou modulu je možnost ovlivnění frekvence oscilátoru, který řídí vnitřní počítač DS1307 při prudké změně teploty. [2]



Obrázek 3.3: Blokové schéma pro získání časových informací z PC

Blok tlačítko

Slouží pro komunikaci mezi mikrokontrolérem a uživatelem v okamžiku měření kalibračních hodnot elektrody. Uživatel potvrzuje nastavení maximální (100 %) a minimální (0 %) koncentrace na vstupu elektrody.

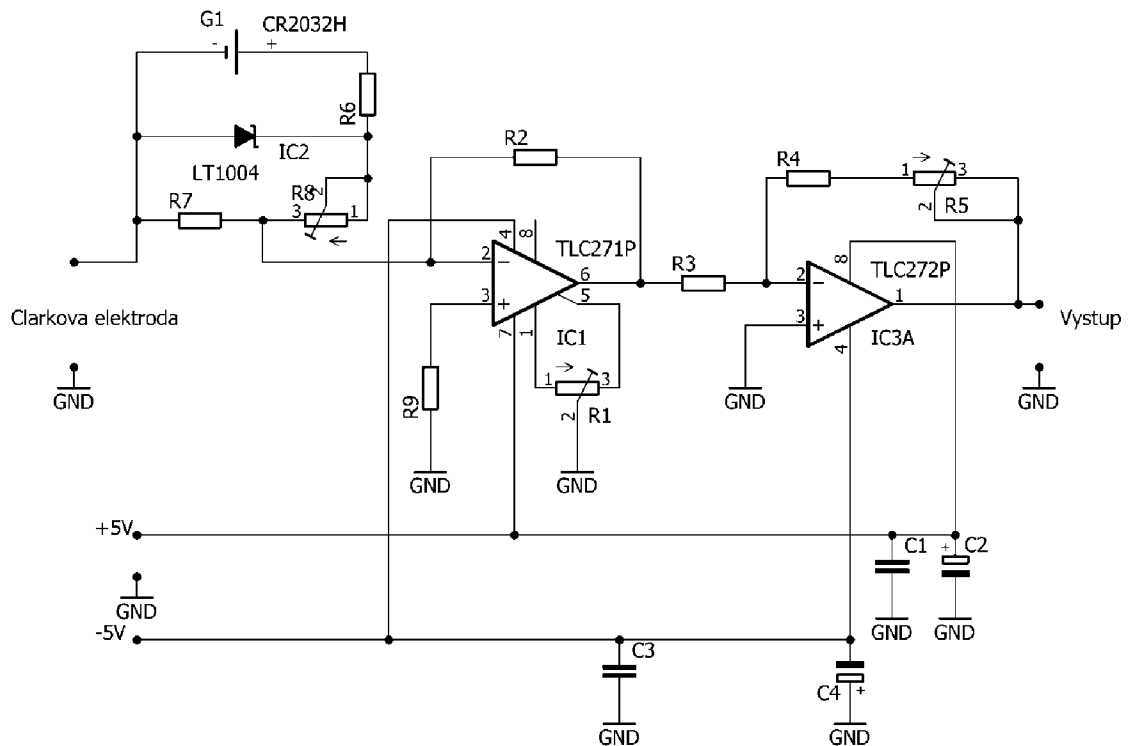
Blok SD karta

Pro naše účely je použit slot pro SD kartu, která je naformátovaná na souborový systém typu FAT16. Na SD kartu jsou zapisovány vstupní parametry a po ukončení měření i parametry výstupní, které lze číst v jakémkoliv počítači pomocí vhodné čtečky. [1]

3.2 Elektrické schéma zapojení

3.2.1 Elektrické schéma vstupní části

Na základě požadavků návrhu zařízení bylo navrženo elektrické schéma, viz Obrázek 3.4.



Obrázek 3.4: Elektrické schéma zapojení vstupní části

Elektrické schéma můžeme rozdělit na několik funkčních částí. V první části je zdroj napětí G1 (alkalická baterie o velikosti napětí 3,6 V) a odporový dělič, kterým nastavujeme pracovní napětí 600 – 700 mV přicházející na Clarkovu elektrodu. Pro výpočet obvodových prvků je třeba zvolit velikost proudu protékající rezistory R7 a R8: $I_{R7/R8} = 0,1 \text{ mA}$

$$R_7 = \frac{0,65}{0,0001} = 6500 \Omega \rightarrow 6800 \Omega$$

$$R_8 = \frac{0,585}{0,0001} = 5850 \Omega \rightarrow 6800 \Omega - (\text{je třeba zvolit trimr od } 0 \text{ do } 6\text{k}8, \text{ řady E24})$$

Velikost odporu R6 vychází z parametrů napěťové reference LT1004 (1,23 V/20 μA), která zajistí polarizační napětí pevné hodnoty napětí.

$$R_6 = \frac{3,6 - 1,235}{0,00002} = \frac{2,365}{0,00002} = 118250 \Omega \rightarrow R_6 = 10 \text{ k}\Omega$$

Druhá část obsahuje převodník proudu na napětí realizovaný operačním zesilovačem. Napětí na výstupu OZ1 je dáno podle Ohmova zákona změnou proudu a odporem ve zpětné vazbě takto:

$$I_{CE} = 5 \cdot 10^{-9} \text{ A}$$

$$U_{OZ1} = R \cdot I_{CE} = 100 \text{ M}\Omega \cdot 5 \cdot 10^{-9} \text{ A} = 500 \cdot 10^{-3} \text{ V} = 0,5 \text{ V}$$

Rezistor, resp. trimr R1 slouží k nastavení napěťové nesymetrie na výstupu (nastavení „nuly“). Výrobce doporučuje volit hodnotu 25 k Ω . Rezistor R9 slouží jako kompenzační prvek ve zpětné vazbě, vzhledem k vysoké hodnotě R2 neovlivňuje hodnota R9 zásadně zesílení zesilovače, je zvolena hodnota: $R_9 = 10 \text{ k}\Omega$.

Třetí část je tvořena operačním zesilovačem. Slouží k zesílení napětí na 0 – 5 V, které přichází na vstup mikrokontroléru.

$$U_{OUT} = -\frac{(R_4 + R_5)}{R_3} \cdot U_{IN}$$

je zvolena velikost rezistoru: $R_3 = 10 \text{ k}\Omega$

při napěťovém zesílení $A = 100$ pak platí, $R_3 \cdot 100 = R_4 + R_5$

je zvolena velikost trimru: $R_5 = 10 \text{ M}\Omega$

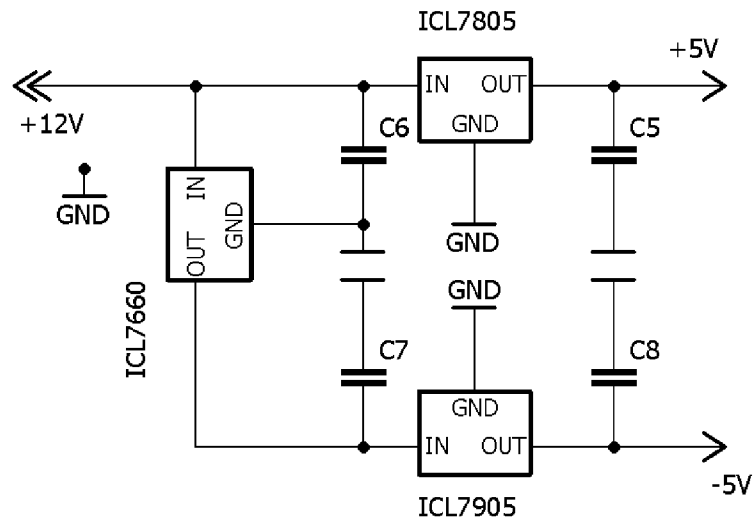
při napěťovém zesílení $A = 10$ pak platí, $R_3 \cdot 10 = R_4 + R_5$

je zvolena velikosti rezistoru: $R_4 = 1 \text{ M}\Omega$

Takto zesílený signál (resp. napětí) z výstupu IC3A je třeba pro další zpracování digitalizovat. K tomu je možné využít AD převodník integrovaný v mikrokontroléru. Hodnota napětí převedená na binární hodnotu (10bitový převodník) je dále využita pro přepočítání na hodnotu naměřené koncentrace kyslíku.

3.2.2 Elektrické schéma napájecí části

Napájecí část elektrického schématu (na Obrázek 3.5) obsahuje na vstupu zdroj napětí 12 V. Napětí je v jedné větvi přiváděno na integrovaný lineární stabilizátor napětí 7805, který stabilizuje vstupní napětí na hodnotu 5 V, toto je využito jako zdroj napětí mikrokontroléru kladné napájecí napětí pro operační zesilovače. Záporná napájecí část je vytvořena pomocí měniče ICL7660, který změní polaritu napětí z kladného napětí o velikosti 12 V na záporné napětí o velikosti -12 V. Záporné napětí je stabilizátorem typu 79L05 stabilizováno na hodnotu -5 V. Toto napětí je dále využito spolu s napětí +5 V jako symetrické napájení pro operační zesilovače.



Obrázek 3.5: Elektrické schéma napájecí části

3.3 Řídící software detektoru kyslíku

Řídící software je sestaven pro mikrokontroléru Arduino Uno v rozšířeném programovacím jazyce Wiring. Mikrokontrolér obsahuje výkonný mikroprocesor ATmega 328P s malou spotřebou energie, pracující mezi 5 V. Velikost datové RAM paměti je 2 kB, velikost programovací paměti EEPROM je 1 kB. Velikost paměti je dostatečná, v případě, že by chtěl uživatel využívat LCD, který nebyl zvolen z důvodu přetečení paměti proměnných je nutné zvolit jiný mikrokontrolér, např. AT Mega 2560. Tento mikrokontrolér má lepší paměťovou výbavu RAM 8 bitů a EEPROM 256 kB. Skládá se z 14 digitálních vstupně-výstupních pinů, zahrnujících 1 hardwarový sériový port a 6 pinů s PWM a I2C rozhraní. Součástí základní desky je 10bitový AD převodník. Tato platforma vyhovuje požadavkům pro řídicí software.

3.3.1 Vývojový diagram programu

Na Obrázek 3.6 jsou zjednodušeně popsány jednotlivé bloky programu. Po spuštění programu dojde k načtení knihoven pro RTC modul (DS1307), slot pro SD kartu, teplotní čidlo a programovatelnou paměť EEPROM. Pro teplotní čidlo je v této části nadefinován vývod 8 pro posílání dat.

```
#include <Arduino.h>
#include <DS1307.h>
#include <SD.h>
#include <OneWire.h>
#include <DallasTemperature.h>
#include <EEPROM.h>
#define DS18B20 8
```

Dále dojde k testování stisknutí tlačítka. Při stisku tlačítka skočí program do smyčky kalibrace (Obrázek 3.7), při které se vypíše poznámka („KALIBRACE - vlož sondu do kalibračního roztoku a zmackni tlačítko“) pro uživatele na sériový monitor a dojde ke změření napěťové hodnoty (minimum) při 0 % nasycení (viz ukázka zdrojového kódu). Program počká a provede podobné měření maximální hodnoty při

100 % nasycení. Hodnoty minimum a maximum se uloží do programovatelné paměti EEPROM na adresu 500 a 502.

```
if (digitalRead(buttonPin) == 0) {
// precti stav tlacitka a rozhodni zda spustit kalibraci
Serial.println ("KALIBRACE- vlož sondu do kalibracniho roztoku
a zmackni tlacitko");
delay(5000);
while (digitalRead(buttonPin) == 0) {
delay(100);
}

delay (100);
while (digitalRead(buttonPin) == 1) {
delay(100); }
```

Pro získání kalibračních hodnot je nutné použít teplotní čidlo z důvodu závislosti Clarkovy elektrody na teplotě. Naměřená hodnota teploty vynásobená hodnotou 100 (odstranění desetinné čárky) se ukládá na programovatelnou paměť EEPROM. (viz ukázka zdrojového kódu) Po naměření maxima, minima a teploty se vypočítá kalibrační rovnice pro možnost dalšího měření.

```
teplota = (sensors.getTempCByIndex(0));
teplota = (teplota*100);
eepromIntWrite(504,teplota); // zapise namerenou teplotu
```

V dalším bloku program provede inicializaci paměťové karty, načte inicializační parametry (interval měření, počet měření) z SD karty, současně nastaví počítadlo počtu měření a provede načtení kalibračních hodnot. V případě, že je v RTC modulu zapsána časová informace (viz ukázka zdrojového kódu), tak program vytvoří řetězec, do kterého запиše aktuální čas měřené hodnoty teploty, napětí a zpracování hodnoty koncentrace kyslíku.

```
RTC.get(rtc, true); // zapíše data z modulu do
pole čísel rtc
char cas[20]; // připraví pole znaků pro
čas
sprintf(cas, "%4d-%02d-%02d;%02d:%02d:%02d", rtc[6], rtc[5],
rtc[4], rtc[2], rtc[1], rtc[0]); // zapíše do pole znaků datum
a cas hodnoty z rtc
```

Dále dojde k naformátování řetězce pro zápis naměřených hodnot, k jejich odeslání a uložení na SD kartu do souboru data.csv. (viz ukázka zdrojového kódu)

```
String dataString = ""; // inicializuje proměnou pro
data
dataString = cas; // čas do proměné data
dataString = dataString + ";"; // vhodný oddělovač
dataString = dataString + String(mereni);
dataString = dataString + ";"; // vhodný oddělovač
dataString = dataString +
String((analogRead(0) * (maximum/ (AOMAX-AOMIN)) - ((maximum/ (AOMAX-
AOMIN)) * AOMIN));
dataString = dataString + ";"; // vhodný oddělovač
dataString = dataString + String(sensors.getTempCByIndex(0));
File dataFile = SD.open("Data.csv", FILE_WRITE); // otevře soubor
```

```

if (dataFile) { // když soubor existuje
                // zapíše do něj
dataFile.println(dataString); // samotný zápis - zapíše a
                                // skočí na nový řádek
dataFile.close();

```

Program přičte do proměnné počet měření číslo 1 a v případě, že se proměnná rovná zadanému inicializačnímu parametru počtu měření, program se ukončí. Na sériovém monitoru je uživatel informován o ukončení měření a možnosti dalšího zpracování dat z SD karty (viz ukázka zdrojového kódu).

```

Serial.println ("Mereni dokonceno - Data byla pridana do souboru
DATA.CSV");

```

3.3.2 Softwarové řešení

Na začátku užívání detektoru je nutné spustit podprogram pro zapsání a synchronizaci aktuálního času do RTC modulu (viz kapitola 3.1 - Blok RTC). Stejný proces musí uživatel provést i v případě, že dojde k výměně baterie v RTC modulu.

```

RTC.stop(); //zastaví čas
RTC.set(DS1307_SEC,0); //nastaví sekundy
RTC.set(DS1307_MIN,37); //nastaví minuty
RTC.set(DS1307_HR,20); //nastaví hodiny
RTC.set(DS1307_DATE,11); //nastaví den v měsíci
RTC.set(DS1307_MTH,5); //nastaví měsíc
RTC.set(DS1307_YR,17); //nastaví rok
RTC.start(); //spustí čas

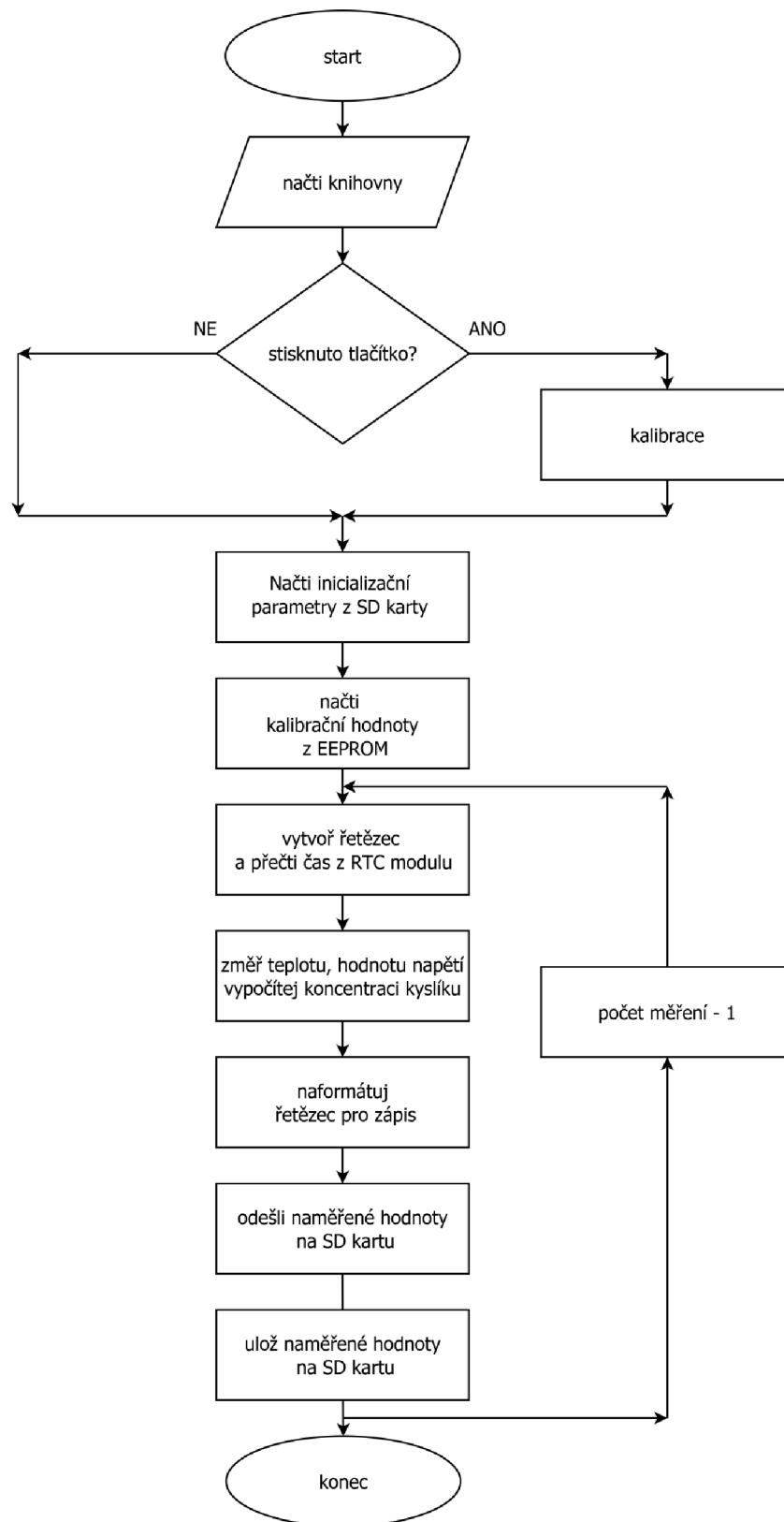
```

Před spuštěním hlavního programu si uživatel zapíše požadované vstupní parametry (interval měření a počet měření) na SD kartu, kterou vloží do slotu na desce mikrokontroléru. Po spuštění programu uživatel může provést kalibraci Clarkovy elektrody pomocí vložení sondy do kalibračního roztoku siřičitanu sodného a zmáčknutí tlačítka pro naměření koncentrace při 0 % nasycení (minimum) a teploty. Stejný proces se opakuje pro naměření kalibrační hodnoty při 100 % nasycení (maximum), kdy je sonda umístěna nad hladinou roztoku siřičitanu sodného. Kalibrační hodnoty se uloží na paměť EEPROM z AD převodníku. Z kalibračních dat (maximum a minimum) vypočítá program směrnici přímky, tím získá rovnici pro výpočet hodnot následujícího měření. Konstanty pro výpočet kalibrační přímky program uloží pro další měření na SD kartu.

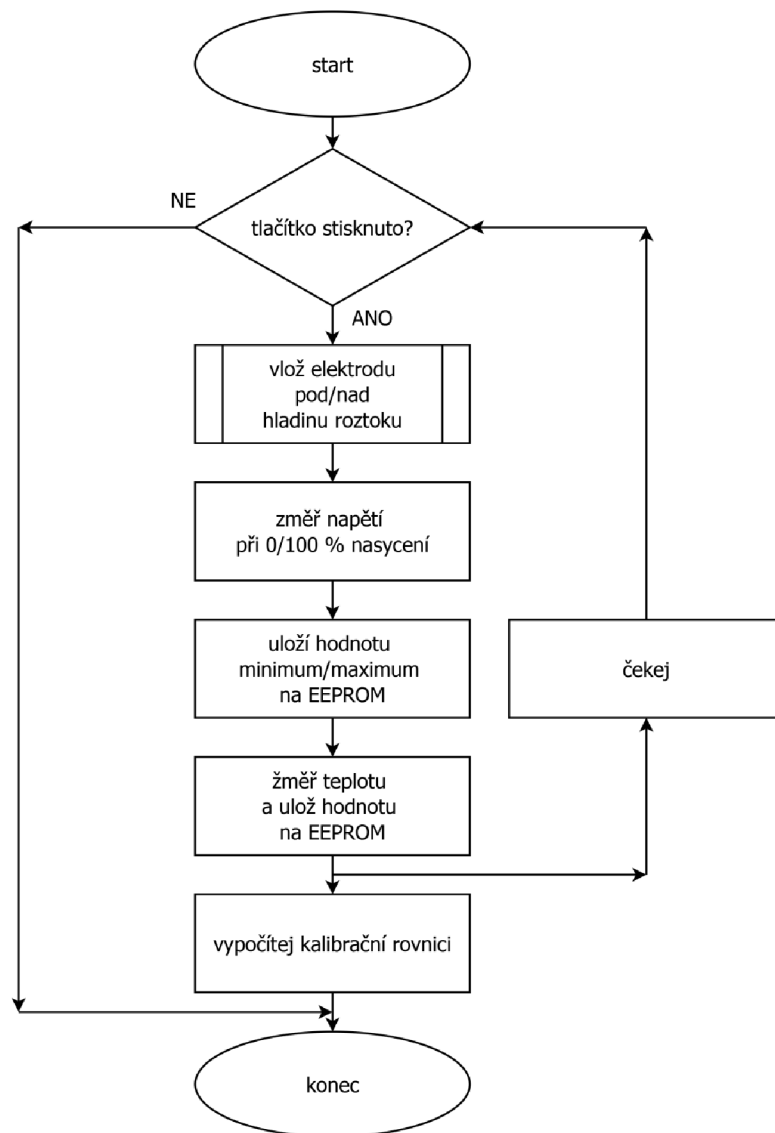
Kalibraci není nutné provádět při každém měření, o její nutnosti rozhoduje uživatel. V případě, že kalibrace není vyžadována, vypíše program předchozí kalibrační hodnoty při naměřené teplotě. V případě, že uživatel vyžaduje novou kalibraci (interval kalibrace doporučuje výrobce 1x týdně, při menší přesnosti pak 1x měsíčně), zmáčkne na začátku programu tlačítko a provede kalibraci podle instrukcí a uloží je na paměť EEPROM.

Po získání kalibračních hodnot a zadání vstupních parametru na SD kartu může uživatel provést měření v buněčném inkubátoru uvnitř buněčné kultury. Po skončení

měření jsou naměřené hodnoty uloženy na SD kartu do souboru „data.csv“ a vypsány na sériový port mikrokontroléru.



Obrázek 3.6: Vývojový diagram hlavního programu



Obrázek 3.7: Vývojový diagram kalibrace Clarkovy elektrody

4 DISKUZE

4.1 Změna zadaného detektoru kyslíku

Podle zadání práce mělo být měření kyslíku v kapalinách uvnitř buněčných inkubátorů využito fluorescenčních sond. Jedná se o skupinu senzorů, založených na měření rozpuštěného kyslíku pomocí fluorescenčních barviv. Tyto sensory reagují na elektrický signál vznikající v důsledku koncentrační nerovnováhy mezi dvěma prostory, na základě změn koncentrace jsou schopny změnit svoji spektrální charakteristiku a tím podávají optickou informaci do okolí. Detekce změn spektrálních charakteristik se provádí pomocí fluorescenčního mikroskopu. Výhodou fluorescenčních sond je rychlost až v řádech jednotek mikrosekund [μs] a malé rozměry zařízení. Nevýhodou je vysoká cena pohybující se v řádech tisíců, technická náročnost a možnost měření kyslíku pouze v roztoku nikoliv i v atmosféře. Hlavní nevýhodou je nekompatibilita s buněčnými kulturami, kdy při měření dochází k toxickým účinkům působícím na buňky.

Dalším vhodným typem biosenzoru pro měření rozpuštěného kyslíku je senzor elektrochemický, který měří hodnotu koncentrace plynu (resp. kyslíku) a pomocí elektrochemického převodníku převádí koncentraci kyslíku (neelektrickou veličinu) na napětí (veličinu elektrickou), které jsme schopni dále měřit. Konkrétním typem elektrochemického senzoru vhodným pro měření rozpuštěného kyslíku v kapalině je Clarkova elektroda, která pracuje na principu polarografie. Výhodou Clarkovy elektrody je snadné technické řešení, kompatibilita s buněčnými kulturami, stabilita systému, cena a možnosti měření v kapalině i atmosféře. Nevýhodou oproti fluorescenčním sondám jsou větší rozměry zařízení a rychlost měření v řádu jednotek sekund [s] a větších.

Po dohodě s vedoucím a konzultantem bakalářská práce pokračovala s využitím Clarkovy elektrody. Clarkova elektroda má více výhod oproti navrhovanému řešení pomocí fluorescenčních sond, které nelze pro účel měření kyslíku v atmosféře a kapalinách buněčných kultur využít z důvodu působení toxických účinků.

Clarkova elektroda byla objednána od firmy Theta 90, která se specializuje na výrobu atypicky řešených elektrod. V daném případě se jednalo o velmi malou elektrodu, která musela rozměrově odpovídat velikosti inkubační (kultivační) komory. Zde došlo ke zdržení práce, kdy se původní termín dodání Clarkovy elektrody ze strany dodavatele prodloužil z 1 týdne na 6 týdnů. Z toho důvodu nebylo možné do data odevzdání práce celkový detektor odladit, v rámci řešení byl tak proveden teoretický návrh a odzkoušeny dílčí části včetně softwaru pro řídicí mikrokontrolér. Tyto části jsou samostatně funkční, rovněž software umí zpracovat získané hodnoty a provádět kalibraci. Z těchto důvodů, tak ale nebyla provedena (do termínu odevzdání práce) série testů kompletního zařízení.

4.2 Volba hardwaru

Práce pokračovala v návrhu softwarového a elektrického řešení detektoru kyslíku. Při softwarovém řešení byl nejprve využit Ethernet shield pro Arduino Uno, který umožňoval komunikaci se sítí. Úmyslem bylo využít Ethernet shield k zápisu výstupních dat a k získání časové informace přímo ze serveru. V průběhu vývoje bylo

navrženo a realizováno jiné řešení. A to, využití Data logging shield V1.0“ fy Deek-Robot, který obsahuje RTC modul a slot pro SD kartu. Tím byla plně nahrazena funkce předchozího Ethernet shieldu a tím odstraněna závislost na internetu (resp. síti Ethernet), která se v průběhu vývoje jevila jako uživatelsky omezující. Nově zvolená varianta s SD kartou umožňuje zadávání vstupních dat (interval měření a počet měření) uživatelem a zároveň uložení a archivaci všech naměřených hodnot pro další využití. Změnou varianty řešení došlo k zapojení RTC modulu (modul reálného času), který byl nově využit pro získání časové informace, aby bylo možné protokol časově identifikovat. RTC modul je třeba při prvním použití nebo výměně baterie znovu nastavit, k tomu slouží samostatně sestavený program. Možnou nevýhodou tohoto řešení oproti původně zamýšlené kalibraci času z internetu (NTP) je menší časová přesnost, která však zásadně neovlivňuje funkci zařízení.

Dále bylo nutné vyřešit možnost čtení naměřených hodnot v průběhu měření. Původně byl navrhnut LDC, od kterého se muselo odstoupit z důvodu přetečení paměti proměnných. Po zaplnění paměti ze 78 % došlo k omezení užívání SD karty. Proto lze výstupní data v průběhu měření číst pouze na sériovém monitoru a nelze zařízení používat samostatně. Pokud bude uživatel použití LCD požadovat je nutné program odladit na desce Arduino s vyššími paměťovými možnostmi, např. Arduino MEGA 2560.

Konečný návrh a realizace detektoru obsahuje Clarkovu elektrodu a teploměr, který slouží jako měřicí část. Teploměr byl do návrhu zařazen z důvodu závislosti Clarkovy elektrody na teplotě okolního prostředí. Používá se při kalibraci a samotném měření dat. Signál získaný z Clarkovy elektrody je nutné zesílit zesilovačem. Zesílený signál přichází na 10bitový AD převodník, který je součástí desky Arduino Uno. K Arduino jsou připojené již zmíněné moduly: teploměr, RTC, slot pro SD kartu a tlačítko. Tlačítko slouží pro komunikaci mezi mikrokontrolérem a uživatelem v okamžiku měření kalibračních hodnot Clarkovy elektrody.

4.3 Kalibrace podle teploty okolí

Kalibrace Clarkovy elektrody probíhá na základě testování zmáčknutí tlačítka. Nutným komponentem pro kalibraci je teploměr. Do návrhu byl zařazen z důvodu závislosti Clarkovy elektrody na teplotě okolního prostředí. Softwarové část kalibrace byla odladěna samostatně mimo buněčný inkubátor, proto je umístěn na řídicí desce Arduino Uno.

5 ZÁVĚR

Cílem bakalářské práce bylo přiblížit problematiku měření koncentrace kyslíku v atmosféře, kapalinách a vybrat vhodnou metodu pro měření a navrhnout zařízení pro měření koncentrace kyslíku v kultivačním roztoku v laboratorních podmínkách.

Začátek práce je věnován podmínkám pro pěstování buněčných kultur a popisu buněčných inkubátorů. Dále je pojednáváno o typech biosenzorů včetně jejich stručných principů. Samotný návrh a realizaci detektoru s Clarkovou elektrodou je věnována kapitola 3. Návrh obsahuje kromě Clarkovy elektrody také napět'ovou referenci, sadu zesilovačů, 10bitový AD převodník, který je součástí desky Arduino Uno, a již zmíněné komponenty teploměru, RTC modulu a slotu pro SD kartu

Vzhledem ke změně práce oproti původnímu zadání došlo po dohodě s vedoucím práce a konzultantem ke změně bodů 4) a 5) a byl proveden návrh za použití Clarkovy sondy. Body 1) až 3) zadání byly splněny a právě díky této rešerši byl zvolen jiný postup řešení, který vedl na modifikaci zadání. Z důvodu pozdějšího dodání Clarkovy elektrody nebylo možné zcela splnit paralelní ověření měření koncentrace O_2 v atmosféře a kultivačním médiu.

LITERATURA

- [1] Arduino. *Arduino* [online]. [cit. 2013-03-24]. Dostupné z: <http://arduino8.webnode.cz/news/lekce-13-arduino-a-sd-karta-ukladame-data/>
- [2] Arduino. *ArduinoBoardUno* [online]. [cit. 2015-01-23]. Dostupné z: <https://arduino.cz/tutorial-uzivani-hodin-realneho-casu-ds1307-a-ds3231-s-arduinem/>
- [3] Arduino. *ArduinoBoardUno* [online]. Dostupné z: <https://www.arduino.cc/en/main/arduinoBoardUno>
- [4] BAHAA E. A. a Malvin Carl TEICH, SALEH. *Základy fotoniky*. Praha: MATFYZPRESS, 1994. ISBN 80-85863-02-2
- [5] BORISOV, S. M., G. NUSS a I. KLIMANT. Ultrabright oxygen optodes based on cyclometalated iridium(III) coumarin complexes. *Analytical Chemistry* [online]. 2007, 79(19):7501–7509. DOI: 10.1021/ac0710836
- [6] BORISOV, S. M., G. NUSS a I. KLIMANT. Red Light-Excitable Oxygen Sensing Materials Based on Platinum(II) and Palladium(II) Benzoporphyrins. *Analytical Chemistry* [online]. 2008, 80(24), 9435-9442 [cit. 2016-12-30]. DOI: 10.1021/ac801521v. ISSN 0003-2700. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ac801521v>
- [7] BRONCOVÁ, Gabriela, KRONĎÁK, ČLUPEK. *In-situ měření pH, vodivosti a kyslíku ve štolě Josef. 1*. Praha: VŠCHT, 2010
- [8] BUERK, Donald G. *Biosensors: theory and applications*. Lancaster [Penn.]: Technomic Pub. Co., c1993. ISBN 0877629757
- [9] ČINÁTL, Jaroslav a Miloš NOVÁK. *Tkáňové a buněčné kultury: příprava a pěstování*. Praha: Státní zdravotnické nakladatelství, 1968
- [10] CUDZIK, Leopold. *Optické biosenzory. 1*. Praha: ČVUT, 2006. ISBN
- [11] ĎAĎO, Stanislav a Marcel KREIDL. *Senzory a měřicí obvody*. Praha: Vydavatelství ČVUT, 1996. ISBN 80-01-01500-9
- [12] Datasheet 18D20. *GME* [online]. Dostupné z: <https://www.gme.cz/data/attachments/dsh.530-067.1.pdf>
- [13] DAVIS, J. M. *Basic cell culture: a practical approach*. 2nd ed. New York: Oxford University Press, 2002. ISBN 0199638535
- [14] DOLEČEK, Jaroslav. *Moderní učebnice elektroniky*. Praha: BEN - technická literatura, 2007. ISBN 978-80-7300-187-2
- [15] DMITRIEV, RI, H ROPIAK, G PONOMAREV, DV YASHUNSKY a DB PAPKOVSKY. Cell-penetrating conjugates of coproporphyrins with oligoarginine peptides: rational design and application to sensing of intracellular O₂. *Bioconj Chem* [online] 2011, [cit. 2011-12-21]. DOI:10.1021/bc200324q
- [16] DMITRIEV, Ruslan I., Honorata M. ROPIAK, Dmitri V. YASHUNSKY, Gellii V. PONOMAREV, Alexander V. ZHDANOV a Dmitri B. PAPKOVSKY. Bactenecin 7 peptide fragment as a tool for intracellular delivery of a phosphorescent oxygen sensor. *FEBS Journal* [online]. 2010, 277(22), 4651-4661 [cit. 2016-12-30]. DOI:

- 10.1111/j.1742-4658.2010.07872.x. ISSN 1742464x. Dostupné z:
<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1742-4658.2010.07872.x>
- [17] DMITRIEV, RI, AV ZHDANOV, GV PONOMAREV, DV YASHUNSKY a DB PAPKOVSKY. Intracellular oxygen-sensitive phosphorescent probes based on cell-penetrating peptides. *Anal Biochem.* 2010, 398(1), 24–33
- [18] DOLEŽAL. Počátky historie kojeneckých inkubátorů, Středočeský vlastivědný sborník. 2004 (22), 107
- [19] DRBOHLAVOVÁ, Jana. a Zdeňka. FOHLEROVÁ. Elektronika a biosenzory: Elektrochemické biosenzory - amperometrické biosenzory. 1. Brno, 2015
- [20] DUNPHY, I, SA VINOGRADOV, DF WILSON. Oxyphor R2 and G2: phosphors for measuring oxygen by oxygen-dependent quenching of phosphorescence. *Anal Biochem.* 2002, 310(2), 191–198
- [21] EGGINS. *Biosensors*. 1. Wiley Chichenster: Wiley Chichenster, 1996
- [22] FAJFR, T. *Elektrochemické senzory pro detekci toxických plynů*. 1. Plzeň: Západočeská Universita v Plzni, 2012
- [23] FERCHER, Andreas, Geli V. PONOMAREV, Dmitri YASHUNSKI a Dmitri PAPKOVSKY. Evaluation of the derivates of phosphorescent Pt-coproporphyrin as intracellular oxygen-sensitive probes. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* [online]. 2010, 396(5), 1793-1803 [cit. 2016-12-30]. DOI: 10.1007/s00216-009-3399-z. ISSN 1618-2642. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00216-009-3399-z>
- [24] FINIKOVA, Olga S., Andrei V. CHEPRAKOV a Sergei A. VINOGRADOV. Synthesis and Luminescence of Soluble meso- Unsubstituted Tetrabenzo- and Tetranaphtho[2,3]porphyrins. *The Journal of Organic Chemistry* [online]. 2005, 70(23), 9562-9572 [cit. 2016-12-30]. DOI: 10.1021/jo051580r. ISSN 0022-3263. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jo051580r>
- [25] GEDDES, CD, DEGRAFF, B. A. a J. N. DEMAS. Luminescence-Based Oxygen Sensors. *Reviews in Fluorescence 2005* [online]. Boston, MA: Springer US, 2005, s. 125 [cit. 2016-12-30]. DOI: 10.1007/0-387-23690-2_6. ISBN 978-0-387-23628-5. Dostupné z: http://link.springer.com/10.1007/0-387-23690-2_6
- [26] GERENCSEK AA, NEILSON A, CHOI SW, EDMAN U, YADAVA N, OH RJ, FERRICK DA, NICHOLLS DG, BRAND MD. Quantitative microplate-based respirometry with correction for oxygen diffusion. *Anal Chem.* 2009, 81(16):6868–6878
- [27] HALAMKA, Petr. *Elektrochemické senzory pro kapaliny a plyny*. 1. Universita Tomáše Bati ve Zlíně: UTB, 2010. ID: 20102713467
- [28] HEYROVSKÝ, Jaroslav a Jindřich FOREJT. *Oscilografická polarografie: polarografie střídavým proudem, její teorie a použití*. Praha: Státní nakladatelství technické literatury, 1953. Řada elektrotechnické literatury
- [29] HOHAN, MC. Phosphorescence quenching method for measurement of intracellular in isolated skeletal muscle fibers. *J Appl Physiol.* 1999, 86(2):720–724
- [30] HYNES, J. Fluorescence-Based Cell Viability Screening Assays Using Water-Soluble Oxygen Probes. *Journal of Biomolecular Screening* [online]. 2003, 8(3), 264-272 [cit. 2016-12-30]. DOI: 10.1177/1087057103008003004. ISSN 1087-

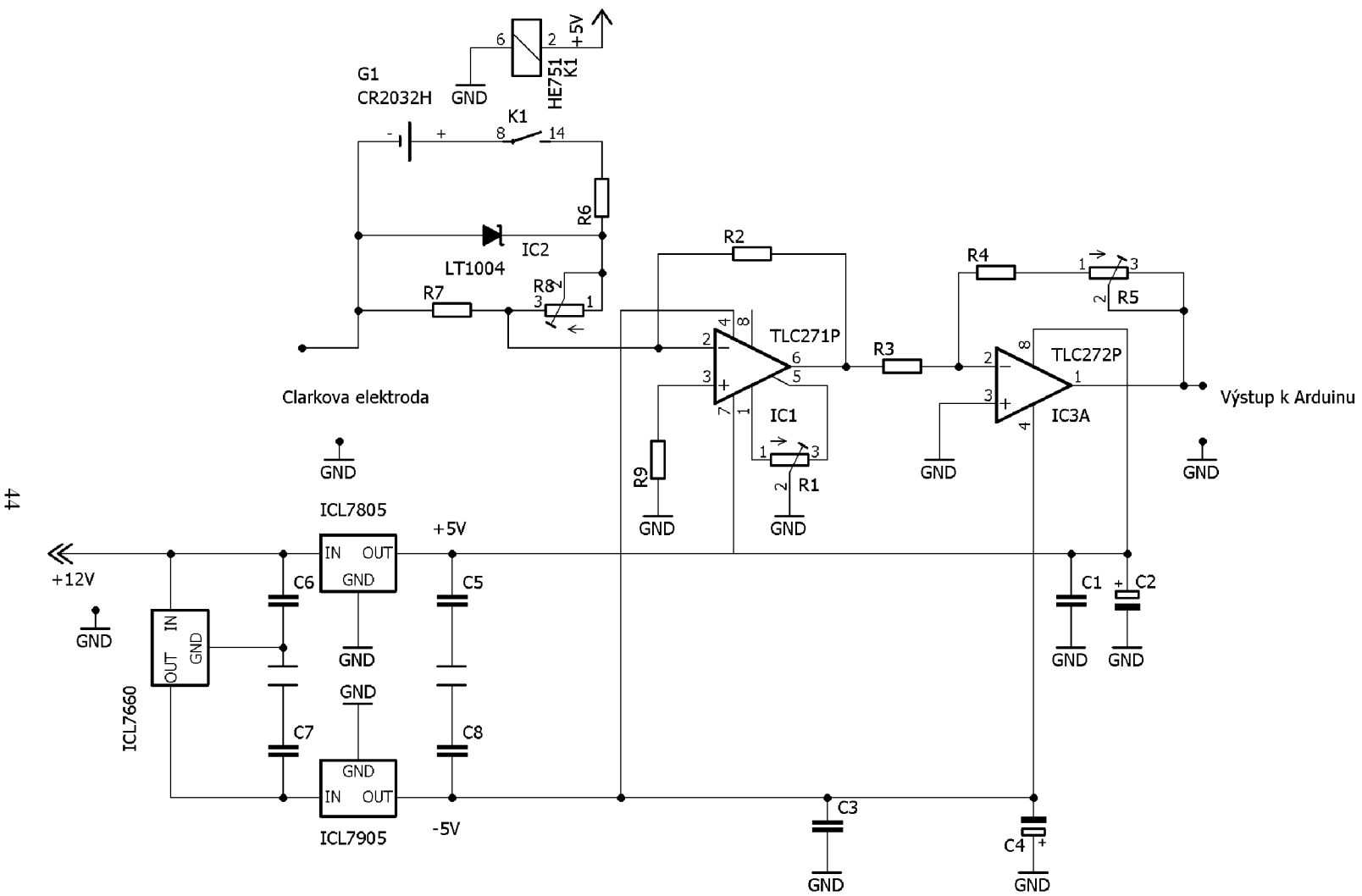
0571. Dostupné z: <http://jbx.sagepub.com/cgi/doi/10.1177/1087057103008003004>
- [31] HYNES J, MARROQUIN LD, OQURTSOV VI, CHRISTIASSEN KN, STEVENS GJ, PAPKOVSKY DB, WILL Y. Investigation of drug-induced mitochondrial toxicity using fluorescence-based oxygen-sensitive probes. *Toxicol Sci.* 2006, 92(1):186–200
- [32] HYNES, James, Edward NATOLI a Yvonne WILL. Fluorescent pH and Oxygen Probes of the Assessment of Mitochondrial Toxicity in Isolated Mitochondria and Whole Cells. *Current Protocols in Toxicology* [online]. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, 2001 [cit. 2016-12-30]. DOI: 10.1002/0471140856.tx0216s40. ISBN 0471140856. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/0471140856.tx0216s40>
- [33] Ibbidi cells in focus. Dostupné z: <http://ibidi.com/xtproducts/en/Cells-Reagents/Optical-O2-Measurement-Beads-and-Nanoparticles/CPOx-Extracellular-O2-Monitoring>
- [34] Ibbidi cells in focus. Dostupné z: <http://ibidi.com/xtproducts/en/Cells-Reagents/Optical-O2-Measurement-Beads-and-Nanoparticles/NanO2-MM2-Intracellular-O2-Imaging>
- [35] KOČÁREK, Eduard, Martin PÁNEK a Drahuše NOVOTNÁ. *Klinická cytogenetika I.: úvod do klinické cytogenetiky : vyšetřovací metody v klinické cytogenetice*. Praha: Karolinum, 2006. Učební texty Univerzity Karlovy v Praze. ISBN 80-246-1069-8
- [36] KOO LEE, Yong-Eun, Ron SMITH a Raoul KOPELMAN. Nanoparticle PEBBLE Sensors in Live Cells and In Vivo. *Annual Review of Analytical Chemistry* [online]. 2009, 2(1), 57-76 [cit. 2016-12-30]. DOI: 10.1146/annurev.anchem.1.031207.112823. ISSN 1936-1327. Dostupné z: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.anchem.1.031207.112823>
- [37] KOO LEE Y-E, ULBRICH EE, KIM G, HAN H, STROLLO C, FAN W, GURJAR R, KOO S, KOPELMAN R. Near infrared luminescent oxygen nanosensors with nanoparticle matrix tailored sensitivity. *Anal Chem.* 2010, 82(20):8446–8455
- [38] KOVÁŘOVÁ, Anežka. *Monoklimatická inkubační komora - řízení teploty komory*. 2015.
- [39] KRÁL V., M. KRONĎÁK, M. ŠŤASTNÝ, R. VOLF, G. BRONCOVÁ, T. SHISHKANOVÁ, K. HLÁVKA a Z. KEJÍK. *Senzory: Chemické senzory*. 1. Praha: VŠCHT Praha, 2007
- [40] KYNCLOVÁ, Hana. *Charakterizace nanostrukturovaných elektrod pro elektrochemické biosenzory*. 2012
- [41] LAKOWICZ, Joseph R., Ewald TERPETSCHNIG, Zakir MURTAZA a Henryk SZMACINSKI. Development of long-lifetime metal-ligand probes for biophysics and cellular imaging. *Journal of Fluorescence* [online]. 1997, 7(1), 17-25 [cit. 2016-12-30]. DOI: 10.1007/BF02764573. ISSN 1053-0509. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/BF02764573>
- [42] LAKOWICZ, J. R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, 2. New York : Kluwer Academic / Plenum Publ., 1999. ISBN 0-306-46093-9

- [43] LEBEDEV AY, CHEPRAKOVAV, SAKADZIC S, BOAS DA, WILSON DF, VINOGRADOV SA. Dendritic phosphorescent probes for oxygen imaging in biological systems. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2009, 1(6):1292–1304
- [44] MARGOLIS, Michael. *Arduino cookbook*. Sebastopol: O'Reilly, 2011. ISBN 978-0-596-80247-9.
- [45] MITRA, Soumya a Thomas H. FOSTER. Photochemical Oxygen Consumption Sensitized by a Porphyrin Phosphorescent Probe in Two Model Systems. *Biophysical Journal* [online]. 2000, 78(5), 2597-2605 [cit. 2016-12-30]. DOI: 10.1016/S0006-3495(00)76804-4. ISSN 00063495. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006349500768044>
- [46] NAPP, Joanna, Thomas BEHNKE, Lorenz FISCHER, et al. Targeted Luminescent Near-Infrared Polymer-Nanoprobes for In Vivo Imaging of Tumor Hypoxia. *Analytical Chemistry* [online]. 2011, 83(23), 9039-9046 [cit. 2016-12-30]. DOI: 10.1021/ac201870b. ISSN 0003-2700. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ac201870b>
- [47] NEUGEBAUER U, PELLEGRIN Y, DEVOCELLE M, FORSTER RJ, SIGNAC W, MORAN N, KEYES TE. Ruthenium polypyridyl peptide conjugates: membrane permeable probes for cellular imaging. *Chem Commun*. 2008, 42:5307–5309
- [48] O'RIORDAN TC, SOINI AE, SOINI JT, PAPKOVSKY DB. Performance evaluation of the phosphorescent porphyrin label: solid-phase immunoassay of alpha-fetoprotein. *Anal Chem*. 2002, 74(22):5845–5850
- [49] OTOVÁ, Berta. *Lékařská biologie a genetika*. Praha: Univerzita Karlova, 2008. ISBN 978-80-246-1594-3
- [50] PAPKOVSKY, Dmitri B. *Methods in Optical Oxygen Sensing: Protocols and Critical Analyses* [online]. s. 715 [cit. 2016-12-30]. DOI: 10.1016/S0076-6879(04)81046-2. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0076687904810462>
- [51] PAVLÍK, D. *Měření spektrálních charakteristik fluorescenčních napětově citlivých barviv*. 1. Brno: VUT FEKT, 2009
- [52] PETRŽÍLKA, Václav a Josef Bartoloměj SLAVÍK. *Piezoelektrina a její použití v technické praxi* .. V Praze: Jednota českých matematiků a fyziků, 1940. Cesta k vědě (Jednota českých matematiků a fyziků)
- [53] PROSSER, V. a kol. *Experimentální metody biofyziky*. 1. Praha : Academia, ISBN 1989. ISBN: 80- 200-0059-3
- [54] RIPKA, Pavel. *Senzory a převodníky*. Praha: Vydavatelství ČVUT, 2005. ISBN 80-01-03123-3
- [55] RUMSEY WL, VANDERKOOI JM, WILSON DF. Imaging of phosphorescence: a novel method for measuring oxygen distribution in perfused tissue. *Science*. 1988, 241(4873):1649–1651
- [56] Senzory v mechatronických soustavách: mechatronika [online]. 2015[cit. 2015-11-10]. Dostupné z: http://mechmes.websnadno.cz/dokumenty/pri-mn-s-10_senzory_uvod.pdf

- [57] SHONAT, Ross D. a Amanda C. KIGHT. Oxygen Tension Imaging in the Mouse Retina. *Annals of Biomedical Engineering* [online]. 2003, **31**(9), 1084-1096 [cit. 2016-12-31]. DOI: 10.1114/1.1603256. ISSN 0090-6964. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1114/1.1603256>
- [58] SCHWEITZER, Claude a Reinhard SCHMIDT. Physical Mechanisms of Generation and Deactivation of Singlet Oxygen. *Chemical Reviews* [online]. 2003, **103**(5), 1685-1758 [cit. 2016-12-31]. DOI: 10.1021/cr010371d. ISSN 0009-2665. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/cr010371d>
- [59] SKLÁDAL. *Biosenzory*. 1. Brno: Masarykova univerzita, 1999
- [60] ŠŤASTNÝ M., M.KRONDĚÁK, R. VOLF, V. KRÁL: *Chemické senzory I*, 2003
- [61] *Theta 90* [online]. Dostupné z: <http://www.theta90.cz/specialni-elektrody.html>
- [62] THOMAS PC, HALTER M, TONA A, RAGHAVAN SR, PLANT AL, FORRY SP. A noninvasive thin film sensor for monitoring oxygen tension during in vitro cell culture. *Anal Chem*. 2009, 81(22):9239–9246
- [63] TRÖGL Josef. *Biosenzory, Automa – časopis pro automatizační techniku* 4 (2006). Dostupné z: www.automa.cz
- [64] TURNER, A. P. F. – KARUBE, I. – WILSON, G. S.: *Biosensors: Fundamentals and Applications*. Oxford University Press, 1987
- [65] VACEK. *Fyzikální základy moderních technologií*. 1. Praha: ČVUT, 2014
- [66] VÁVROVÁ, Jaroslava. *Encyklopedie laboratorní medicíny pro klinickou praxi* [online]. 2016 [cit. 2016-12-14]. Dostupné z: <http://www.enclabmed.cz>
- [67] VOBECKÝ, Jan a Vít ZÁHLAVA. *Elektronika: součástky a obvody, principy a příklady*. 3., rozš. vyd. Praha: Grada, 2005. ISBN 80-247-1241-5.
- [68] VOJÁČEK, A. Citlivé senzory rozpuštěného i plynného kyslíku [online]. , 2 [cit. 2008-7-16]. Dostupné z: <http://automatizace.hw.cz/citlive-senzory-rozpusteneho-i-plynneho-kysliku>
- [69] X-d WANG, GORRIS HH, STOLWIJK JA, MEIER RJ, GROEGEL DBM, WEGENER J, WOLFBEIS OS. Self-referenced RGB colour imaging of intracellular oxygen. *Chem Sci*. 2011, 2(5):901–906
- [70] ZEHNULA, Karel. *Snimače neelektrických veličin*, SNTL Praha, 1986
- [71] ZITOVÁ A, HYNES J, KOLLAR J, BORISOV SM, KLIMANT I, PAPKOVSKY DB. Analysis of activity and inhibition of oxygen-dependent enzymes by optical respirometry on the LightCycler system. *Anal Biochem*. 2010, 397(2):144–151
- [72] UURBIER CJ, MIK EG, JOHANNES T, HEINEM A, HOUBEN-Weerts JHPM, BALESTRA GM, STAP J, BEEK JF, INCE C. In vivo mitochondrial oxygen tension measured by a delayed fluorescence lifetime technique. *Biophys J*, 95(8):3977–3990

PŘÍLOHY

Celkové elektrické schéma zapojení



Rozpiska součástek

Součástka	Hodnota/typ	Popis
R1	25 k Ω	Cermetový trimr PT73YEK020 20K
R2	100 M Ω	Rezistor 100M
R3	10 k Ω	Rezistor 10K
R4	1 M Ω	Rezistor 1M
R5	10 M Ω	Cermetový trimr
R6, R9	10 k Ω	Rezistor 10k
R7	6800 Ω	Rezistor 6k8
R8	6800 Ω	Cermetový trimr 64 P 10K
LT1004	123 V/20 μ A	Napěťová reference LM385Z-1,2
OZ1/OZ2	TLC271P/ TLC272P	Operační zesilovač
G1	3,6 V	Držák baterie do DPS + baterie CR2032
K1	HE751	Jazyčkové relé COSMO RELED1A 051 000
IO	ICL7660	Integrovaný obvod ICL7660ACPA DIP8
IC4	79L05	Stabilizátor pevného napětí
IC5	78L05	Stabilizátor pevného napětí
C2, C4, C6, C8	10u/25V	Elektrolytický kondenzátor CE
C1, C3, C5, C7	100n/63V	Keramický kondenzátor CK

Kalibrační tabulka

Pozn.: v příloze je pouze použitý rozsah pro danou aplikaci, tj. hodnoty pro teploty od 20 °C do 30,9 °C

t [°C]	Cp [mg/l]	t [°C]	Cp [mg/l]	t [°C]	Cp [mg/l]
20,00	9,02	24,10	8,32	28,20	7,69
20,10	9,00	24,20	8,30	28,30	7,68
20,20	8,98	24,30	8,29	28,40	7,66
20,30	8,97	24,40	8,27	28,50	7,65
20,40	8,95	24,50	8,25	28,60	7,64
20,50	8,93	24,60	8,24	28,70	7,62
20,60	8,91	24,70	8,22	28,80	7,61
20,70	8,90	24,80	8,21	28,90	7,59
20,80	8,88	24,90	8,19	29,00	7,58
20,90	8,86	25,00	8,18	29,10	7,56
21,00	8,84	25,10	8,16	29,20	7,55
21,10	8,82	25,20	8,14	29,30	7,54
21,20	8,81	25,30	8,13	29,40	7,52
21,30	8,79	25,40	8,11	29,50	7,51
21,40	8,77	25,50	8,10	29,60	7,49
21,50	8,75	25,60	8,08	29,70	7,48
21,60	8,74	25,70	8,07	29,80	7,47
21,70	8,72	25,80	8,05	29,90	7,45
21,80	8,70	25,90	8,04	30,00	7,44
21,90	8,68	26,00	8,02	30,10	7,42
22,00	8,67	26,10	8,01	30,20	7,41
22,10	8,65	26,20	7,99	30,30	7,40
22,20	8,63	26,30	7,98	30,40	7,38
22,30	8,62	26,40	7,96	30,50	7,37
22,40	8,60	26,50	7,95	30,60	7,35
22,50	8,58	26,60	7,93	30,70	7,34
22,60	8,56	26,70	7,92	30,80	7,32
22,70	8,55	26,80	7,90	30,90	7,31
22,80	8,53	26,90	7,89		
22,90	8,52	27,00	7,87		
23,00	8,50	27,10	7,86		
23,10	8,48	27,20	7,84		
23,20	8,46	27,30	7,83		
23,30	8,45	27,40	7,81		
23,40	8,43	27,50	7,80		
23,50	8,42	27,60	7,78		
23,60	8,40	27,70	7,77		
23,70	8,38	27,80	7,75		
23,80	8,37	27,90	7,74		
23,90	8,35	28,00	7,72		
24,00	8,33	28,10	7,71		