



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA STROJNÍHO INŽENÝRSTVÍ

FACULTY OF MECHANICAL ENGINEERING

ÚSTAV STROJÍRENSKÉ TECHNOLOGIE

INSTITUTE OF MANUFACTURING TECHNOLOGY

AUTOMATIZOVANÝ BIOREAKTOR PRO KULTIVACI ŽIVÝCH BUNĚK

AUTOMATED BIOREACTOR FOR THE CULTIVATION OF LIVING CELLS

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. IVETA UKROPCOVÁ

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. ZBYNĚK DOSTÁL, Ph.D.

BRNO 2020

Zadání diplomové práce

Ústav: Ústav fyzikálního inženýrství
Studentka: **Bc. Iveta Ukropcová**
Studijní program: Aplikované vědy v inženýrství
Studijní obor: Přesná mechanika a optika
Vedoucí práce: **Ing. Zbyněk Dostál, Ph.D.**
Akademický rok: 2019/20

Ředitel ústavu Vám v souladu se zákonem č. 111/1998 o vysokých školách a se Studijním a zkušebním řádem VUT v Brně určuje následující téma diplomové práce:

Automatizovaný bioreaktor pro kultivaci živých buněk

Stručná charakteristika problematiky úkolu:

Plně robotizované kultivační zařízení (bioreaktor) se při biologických experimentech jeví jako nezbytné. Toto zařízení bude umožňovat řízenou změnu kultivačních podmínek živých buněk a bude případně vybaveno minimálně jednou pozorovací komorou. V komoře bude možno řídit koncentrace roztoků látek v médiu a také kontrolovat atmosféru s CO₂.

Biologická část práce bude garantována Ing. Danielem Zichou, CSc.

Cíle diplomové práce:

- 1) Rešerše stávajících systémů pro řízení změny kultivačních podmínek živých buněk.
- 2) Úprava stávajícího konceptu bioreaktoru, případně návrh nového řešení.
- 3) Návrh obslužného příslušenství pro řízení změny kultivačních podmínek.
- 4) Testování bioreaktoru.

Seznam doporučené literatury:

LATHAM, T. W. Fluid motions in a peristaltic pump. Diss. Massachusetts Institute of Technology, 1966.

FIDALGO, L. M. a S. J. MAERKL. A software-programmable microfluidic device for automated biology. Lab on a Chip [online]. 2011, 11(9) [cit. 2019-11-07]. DOI: 10.1039/c0lc00537a. ISSN 1473-0197.

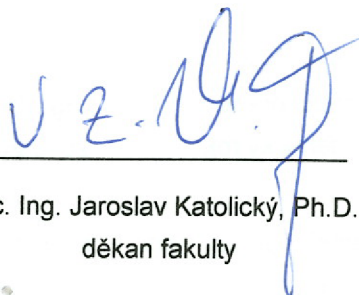
KOCH, S. Optical flow-cell multichannel immunosensor for the detection of biological warfare agents. Biosensors and Bioelectronics [online]. 2000, 14(10-11), 779-784 [cit. 2019-11-07]. DOI: 10.1016/S0956-5663(99)00051-2. ISSN 09565663.

Termín odevzdání diplomové práce je stanoven časovým plánem akademického roku 2019/20.

V Brně, dne 24. 10. 2019



prof. RNDr. Tomáš Šíkola, CSc.
ředitel ústavu



doc. Ing. Jaroslav Katolický, Ph.D.
děkan fakulty

Abstrakt

Řízení kultivačních podmínek při mikroskopování živých buněk rozšiřuje možnosti biologických experimentů a zlepšuje jejich výpovědní hodnotu. Aby změny podmínek byly kontrolované a reprodukovatelné, je nutné omezit množství potřebných úkonů vykonávaných uživatelem mikroskopu a nahradit je automatizovanými procedurami. Proto byl vytvořen koncept nového automatizovaného kultivačního zařízení (bioreaktoru). Toto zařízení řídí výměnu média v pozorovací komoře, zajišťuje cirkulaci a výměnu atmosféry a kontroluje její složení. Bioreaktor je určen pro použití v Laboratoři experimentální biofotoniky. Tato laboratoř disponuje koherencí řízeným holografickým mikroskopem (CCHM), který využívá metody kvantitativního fázového zobrazování (QPI). Bioreaktor je proto přizpůsoben aktuálním požadavkům této laboratoře a jeho optické části vyhovují nárokům metody QPI.

V textu jsou specifikovány kultivační podmínky živých buněk a jsou shrnuty možnosti, jak je lze během mikroskopování řídit. Dále jsou popsána vybraná komerčně dostupná zařízení a je zhodnocena jejich vhodnost pro použití v Laboratoři experimentální biofotoniky. Stěžejní část práce se věnuje návrhu, realizaci a testování nového bioreaktoru.

Summary

Control of cultivation conditions in the live cell imaging extends the possibilities of biological experiments and makes the experimental results more reliable. In order to change the cultivation conditions in a controlled manner and increase the reproducibility of the experiments, it is necessary to reduce the amount of manual operations and replace them with automated procedures. Therefore, the concept of a new automated culture device (bioreactor) was created. This device controls the exchange of medium in the observation chamber, ensures the circulation and exchange of the atmosphere and controls its composition. The bioreactor is intended for use in the Laboratory of Experimental Biophotonics. This laboratory is equipped with coherence-controlled holographic microscope (CCHM), which uses quantitative phase imaging (QPI) method. Thus, the bioreactor is adapted to the current requirements of this laboratory and optical elements of the bioreactor meet the requirements of the QPI method.

This text specifies the cultivation conditions of the living cells and summarizes, how the conditions could be controlled in the live cell microscopy. Next some commercially available culture devices are described and assessed, whether they are convenient for the use in Laboratory of Experimental Biophotonics. The crucial part of the thesis is the design, construction and testing of the new bioreactor.

Klíčová slova

Mikroskopie živých buněk, kultivační podmínky, kultivační zařízení, koherencí řízený holografický mikroskop.

Keywords

Live cell microscopy, cultivation conditions, culture device, coherence-controlled holographic microscope.

UKROPCOVÁ, I. *Automatizovaný bioreaktor pro kultivaci živých buněk*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta strojního inženýrství, 2020. 65 s. Vedoucí diplomové práce Ing. Zbyněk Dostál, Ph.D..

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně, pouze za odborného vedení Ing. Zbyňka Dostála, Ph.D., a všechny podklady jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

.....

V Brně 26. června 2020.

Poděkování

Poděkování patří Ing. Zbyňku Dostálovi, Ph.D za vedení diplomové práce, časté konzultace, přínosné rady a velmi ochotný přístup. Dále děkuji MUDr. Pavlu Veselému, CSc. za odborné rady a za návrh pozorovací komory. Děkuji také Ing. Martinu Antošovi, Ph.D. za praktickou pomoc s realizací bioreaktoru.

Obsah

Úvod	3
1 Kultivační podmínky a jejich řízení	5
1.1 Proudění média	5
1.1.1 Peristaltická čerpadla	6
1.2 Teplota	8
1.3 Atmosféra	12
2 Komerčně dostupné systémy pro řízení kultivačních podmínek	15
2.1 Ibidi	15
2.2 Cherry Biotech	17
2.3 Fluigent	19
2.4 Bioptechs	21
3 Mikroskopie živých buněk v Laboratoři experimentální biofotoniky	25
3.1 Koherencí řízený holografický mikroskop	25
3.2 Pozorovací komory pro CCHM	27
3.3 Příslušenství CCHM a zhodnocení vhodnosti komerčně dostupných zařízení	27
4 Cíle diplomové práce	29
5 Návrh automatizovaného systému bioreaktoru	31
5.1 Popis a funkce bioreaktoru	31
6 Realizace automatizovaného bioreaktoru	35
6.1 Pozorovací komora	35
6.2 Mechanika	36
6.2.1 Peristaltické pumpy poháněné servomotory	36
6.2.2 Přepínací ventil	40
6.2.3 Přepínač hadiček	40
6.2.4 Škrtidlo	42
6.2.5 Zvlhčovač atmosféry	43
6.2.6 Hadičky	43
6.3 Elektronika	44
6.3.1 Senzor ExplorIR®-M	44
6.3.2 Řídící karta SOS-AT	47
6.3.3 Spínací relé	49
6.4 Software	51
6.4.1 Program uživatelského rozhraní	52
6.4.2 Řízení bioreaktoru pomocí tlačítek	53
6.4.3 Automatická regulace oxidu uhličitého	55

7 Testování bioreaktoru	57
Závěr	61
Literatura	65

Úvod

Během pozorování živých buněk na optických mikroskopech jsou buňky umístěny v pozorovacích komorách. Některé komory umožňují během experimentů proudění média. Takové komory bývají označovány jako perfuzní nebo průtokové. Komory bez proudění média se nazývají stacionární. Pokud médium proudí v komorách nebo kanálcích, které mají rozměry v řádu mikrometrů, nazýváme tato zařízení jako mikrofluidické komory nebo mikrofluidické čipy.

Jak se v průběhu mnoha let vyvíjely mikroskopy a biologické aplikace, vyvíjely se i pozorovací komory. Proto dnes existuje velké množství designů komor. Mezi nejjednodušší z nich patří klasická mikroskopická sklíčka nebo Petriho misky a naopak mezi nejkomplikovanější patří automatizované mikrofluidické čipy. Avšak pro všechny pozorovací komory platí, že by měly splňovat určité požadavky. Předně musí mít výborné optické vlastnosti, aby neovlivňovaly chod paprsků a nezhoršovaly tak výsledné zobrazení mikroskopem. Pro specifikaci optických parametrů je tedy důležité vědět, na jakém mikroskopu budou komůrky používány. V této práci se zabývám komůrkami pro holografický mikroskop CCHM, který je umístěn v Laboratoři experimentální biofotoniky. Proto v části 3 bude CCHM stručně popsán a budou zmíněny optické požadavky vyplývající z principu jeho funkce.

Další požadavky na pozorovací komory se týkají fyziologických podmínek buněk. Komory by v žádném případě neměly buňky negativně ovlivňovat. To znamená, že by měly mít dostatečnou velikost, měly by být naprosto sterilizovatelné, izolované od okolního prostředí víčkem těsněním a měly by být vyrobeny z chemicky stabilních materiálů, které jsou biokompatibilní. U mnoha biologických aplikací je však žádoucí, nejen aby buňky nebyly komůrkami negativně ovlivňovány, ale naopak aby komory spolu s dalším příslušenstvím vhodné fyziologické podmínky vytvářely. Specifikací fyziologických podmínek a příslušenstvím pro jejich řízení se zabývá část 1.

V části 2 je rešerše komerčně dostupných systémů pro řízení kultivačních podmínek. Jelikož však bylo zjištěno, že žádné komerčně dostupné řešení nevyhoje plně specifikovaným požadavkům, bylo navrženo a zrealizováno vlastní automatizované zařízení pro řízení kultivačních podmínek (tzv. systém bioreaktoru). Ten je popsán v částech 5 a 6. A nakonec v části 7 je popsáno jeho testování.

1. Kultivační podmínky a jejich řízení

1.1. Proudění média

Pozorovací komory lze obecně rozdělit na otevřené a uzavřené [1]. Otevřené systémy umožňují lepší přístup k buňkám a jednodušší manipulaci s médiem. Během pozorování se v nich však pomalu vyrovnává složení atmosféry v komůrce a v okolí, což má vliv i na pH média. Uzavřené komory jsou utěsněny, takže nedochází k vypařování média a k výměně plynů s okolní atmosférou. Manipulace s buňkami a s médiem je však obtížnější. Většina uzavřených komůrek obsahuje porty pro přívod a odvod média. Takové komůrky se nazývají průtokové. Průtokové komůrky jsou velmi užitečné pro mikroskopové techniky s vysokým rozlišením. Tyto mikroskopy totiž potřebují objektivy i kondenzory s velkou numerickou aperturou a kvůli tomu mají obvykle malou pracovní vzdálenost. Lze tedy používat jen malé kultivační komory s malým objemem média, které pokud neumožňují výměnu média, nejsou vhodné pro dlouhodobé pozorování buněk [1].

Během proudění média se může objevit několik problémů. Jeden z nich je prohýbání sklíčka při změně průtoku. Prohýbání sklíčko mechanicky namáhá, a navíc způsobuje, že pozorované buňky, které jsou ke sklíčku přichyceny, se posunují mimo rovinu ostrosti. Problém mohou také způsobovat pumpy s krokovými motory. Ty totiž mohou vytvářet hydrodynamické pulsy, které mohou narušovat některé experimenty. Pulsy mohou být eliminovány použitím pokročilých čerpadel, která jsou vybavena regulovanými stejnosměrnými motory připojenými přes převod do pomala k vřetenu vybaveného senzorem rychlosti [1]. Další problém je tvorba vzduchových bublin kvůli netěsnostem a zavzdušnění systému. Bubliny v komoře mohou způsobovat turbulence a zhoršovat zobrazení. Některé buněčné linie jsou citlivé na smykové napětí, a proto při práci s těmito buňkami musí výměna média probíhat při nízkých průtokových rychlostech. Navíc buňky mohou být proudem dokonce i odpaleny. To lze omezit přilnutím buněk k povrchu sklíčka. Některé buňky přilnou ke sklíčku přirozeně samy. U ostatních buněk je možné adhezi podpořit povlakováním dna komory (např. polylysinem, kolagenem nebo fibronectinem [2]).

Proudění média v komoře je zajištěno dodáváním nového média do komory skrz vstupní port a nové médium vytlačuje staré médium skrz výstupní port ven. Někdy je používán opačný přístup, kdy staré médium je na výstupním portu odsáváno pumpou a nové médium je nasáváno podtlakem. Pohon pro pohyb kapalin může být gravitační spád, manuální vstříknutí stříkačkou, peristaltická pumpa, stříkačková pumpa a nebo vytvoření přetlaku v tlakových zkumavkách [1]. Gravitační spád je nejjednodušší a nejlevnější technika, ale je při ní obtížné regulovat průtok a proud není příliš laminární. Realizuje se obvykle pomocí velké zásobní nádrže média umístěné vysoko nad komůrkou připojené sterilní hadičkou. Průtok může být kontrolován polohou zásobní nádrže, ventilem na výstupu z komůrky nebo nahoře na nádrži. Pro experimenty, kde však záleží na přesném dávkování roztoků nebo na přesném průtoku, je nutné použít sofistikovanější sys-

témy. Stříkačkové pumpy jsou pro přesné dávkování vhodnější než gravitační spád. Kvůli omezenému objemu stříkačky však nejsou vhodné pro dlouhodobé zásobování. Pro dlouhodobé experimenty se tedy jeví jako nejvhodnější použití peristaltických pump nebo tlakování zkumavek vzduchem (viz v části 2 systémy Perfusion Pack od firmy Cherry Biotech a Organ-On-Chip od firmy Fluigent).

1.1.1. Peristaltická čerpadla

Teorie peristaltického pohybu

Peristaltické čerpání je forma transportu tekutin, ke které dochází, když vlna kontrakcí postupuje v rozpínatelné hadici obsahující kapalinu [3]. V lidském těle se peristaltickým pohybem transportují tekutiny v mnoha trubicích z hladké svaloviny, např. ve žlučovodu, v močovodu, v jícnu při polykání potravy, v lymfatických cévách, ve střevech apod [3]. Tento mechanismus je však také využit v peristaltických pumpách, někdy nazývaných též hadicové pumpy [4].

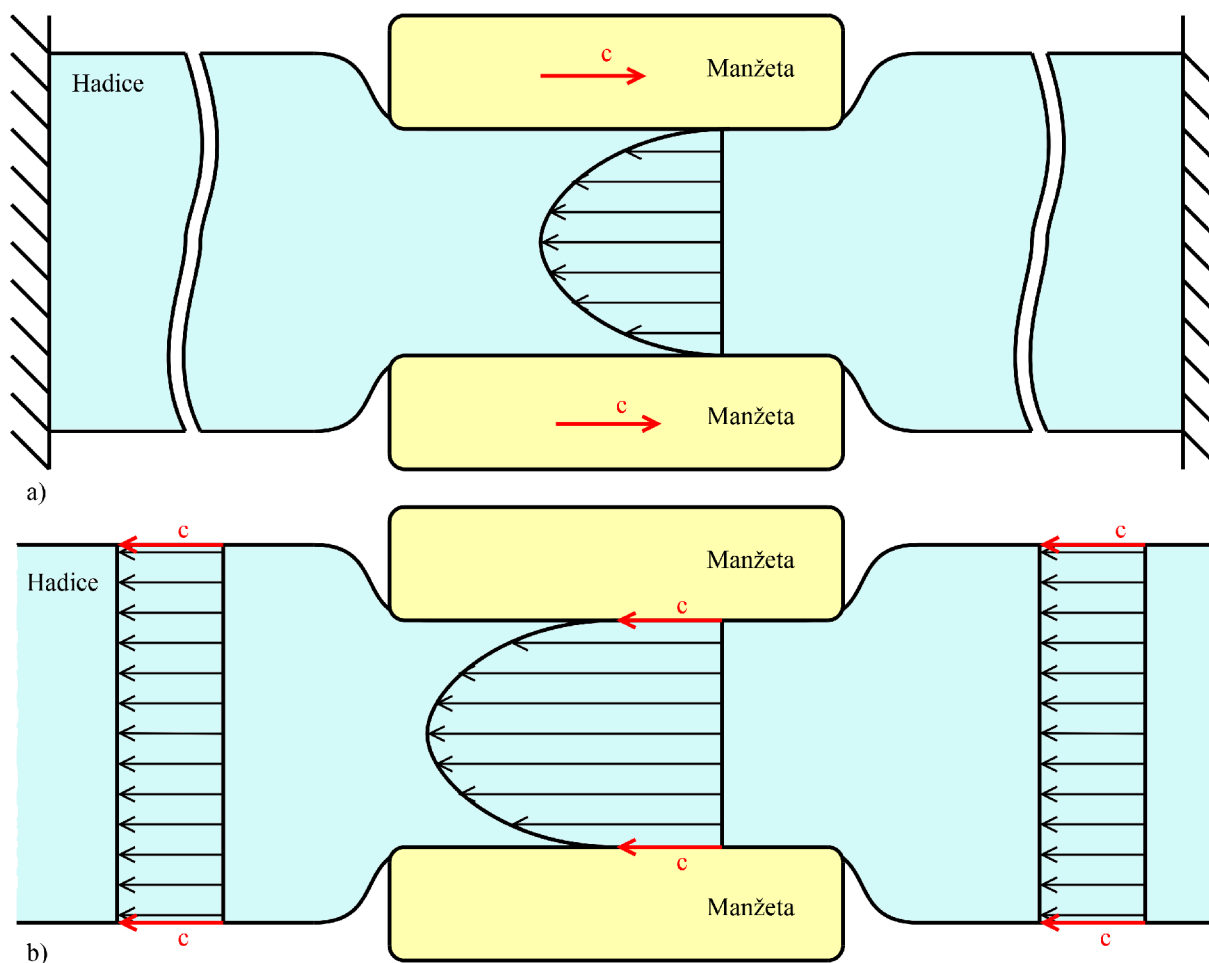
Princip peristaltického čerpání spočívá ve zmáčknutí hadice, aby se úplně nebo téměř úplně uzavřela, a posunu zmáčknutého místa po hadici, čímž se posouvá i kapalina v hadici. Mechanika peristaltického pohybu bude popsána na dvou případech: a) hadice je pevně ukotvena a pohybuje se po ní manžeta a b) manžeta se nepohybuje, ale v hadici proudí kapalina (viz obr. 1.1).

V případě a) uvažujeme velmi dlouhou nepohyblivou hadici a uzavřenou na obou koncích. Na hadici se rychlostí c pohybuje posuvná manžeta směrem doprava a vytváří tak peristaltickou vlnu. Kvůli uzavřeným koncům, není v oblasti velkých průřezů hadice žádné proudění. Díky nestlačitelnosti kapaliny se však v zúženém místě hadice tekutina přelévá zprava doleva. Proudění kapaliny v hadici je tedy nestacionární (tj. proudění je v daném místě hadice závislé na čase).

V případě b) se manžeta nepohybuje a proto obálka vlny se jeví jako nehybná. Stěny hadice a kapalina v místech velkého průřezu se pohybují doleva rychlostí c . Relativní pohyb stěn hadice vůči manžetě je tedy v případě a) i b) stejný. Kvůli zachování objemu nestlačitelné kapaliny musí průměrná rychlost kapaliny v zúženém místě přesáhnout rychlost c . Uvažujeme-li viskózní kapalinu bez setrvačnosti, pak musí rychlostní profil mít tvar paraboly s rychlostí c na stěnách [3].

V obou případech není v místech velkého průřezu hadice žádný gradient tlaku, ale v zúženém místě kvůli viskózním ztrátám klesá tlak zprava doleva. Peristaltická vlna tak vytváří stoupající tlak ve směru šíření vlny. Z toho vyplývá závěr, že peristaltické čerpání je závislé na viskozitě kapaliny. Bez viskózních ztrát by v zúženém místě nevznikl žádný rozdíl tlaků a k čerpání kapaliny by vůbec nedošlo.

Další závěr o peristaltickém pohybu získáme z představy, že hadice v systému laboratoře má otevřené konce. Jak se bude manžeta posouvat po hadici vpravo, bude před sebou tlačít kapalinu. V rozšířené části hadice tedy kapalina proudí směrem doprava (tj. ve směru peristaltické vlny), zatímco v zúženém místě proud kapaliny směřuje doleva



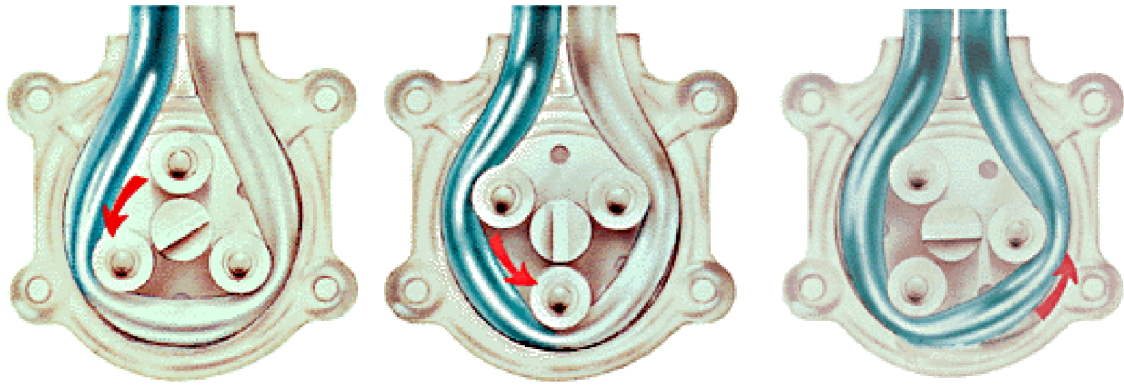
Obrázek 1.1: Ilustrace peristaltického čerpání: a) v nepohyblivé hadici s pohybující se manžetou, b) v pohybující se hadici s nepohyblivou manžetou. Překresleno z [3].

(tj. proti směru peristaltické vlny). Oproti případu s otevřenými konci se však proud v zuženém místě zmenší [3].

Konstrukce a použití peristaltických čerpadel

Peristaltická čerpadla jsou objemová čerpadla a začaly se objevovat v 30. letech 20. století [5]. Flexibilní hadice s čerpanou kapalinou je umístěna v kruhovém krytu. Klady nebo vačky umístěné na kraji rotoru, střídavě mačkají a uvolňují hadici a dochází tak k násávání a vytlačování kapaliny ven čerpadla. (viz obr. 1.2) [6].

Peristaltické pumpy často vyžadují mazání pro odvod tepla a snížení opotřebení hadice. Jako mazivo se obvykle používá glycerol, který je poměrně drahý. Design rotoru s vačkami vyžaduje větší množství maziva než rotor s klady, protože při tření vaček po hadici se vytváří více tepla než při odvalování kladek. Kvůli velkému množství vzniklého tepla nemohou být pumpy s vačkami používány v kontinuálním režimu při vysokých otáčkách. Například peristaltická pumpa s vačkami s průměrem rotoru 3 palců může v kontinuálním režimu čerpat maximálně rychlostí 40 ot/min [5]. Pro čerpání při vyšších otáčkách je nutné použít čerpadlo s klady a nebo čerpadlo s vačkami po např.



Obrázek 1.2: Ilustrace principu peristaltického čerpadla. Tři obrázky znázorňují tři časové snímky čerpání. Červená šipka ukazuje směr otáčení rotoru. Převzato a upraveno z [7].

2 hodinách provozu vypnout a nechat zchladit. Některé aplikace proto pro dosažení kontinuálního režimu využívají dvě pumpy, které se střídají v čerpání. Čerpadla s kladkami mohou v mnoha případech fungovat i úplně bez maziva [5].

Údržba peristaltických čerpadel je velmi jednoduchá. Jediná část, kterou je nutné pravidelně měnit, je hadice a případné mazivo. Hlavním faktorem životnosti hadic je počet stlačení hadice během jedné otáčky. Čerpadla s menším počtem kladek nebo vaček pomaleji opotřebovávají hadici. Nejčastěji bývá počet vaček nebo kladek dvě nebo tři. Avšak za účelem dlouhé životnosti se již vyrábějí i jedno-kladková čerpadla. Čerpadla s vačkami vyvíjejí více tepla, které ničí hadice, a proto se pro čerpadla s extrémně dlouhou životností nepoužívají [5].

Peristaltické pumpy se používají tehdy, když je žádoucí, aby transportovaná kapalina nepřicházela do styku s mechanickými částmi pumpy. Ať už kvůli tomu, aby kapalina nepoškodila pumpu (např. čerpání abrazivních nebo korozivních kapalin, případně žíravín, pokud to hadice umožňuje) a nebo aby čerpaná kapalina nebyla kontaminována (např. čerpání krve, potravin apod.) Tato čerpadla jsou také vhodná pro konstantní čerpání velmi viskózních kapalin, které by se obtížně čerpaly jinými druhy pump [5]. Další jejich výhody jsou, že nepotřebují odzdušnění hadice před začátkem čerpání, protože jsou samonasávací a také nepotřebují těsnění [6]. Naopak jejich nevýhody je malý průtok a vznik pulzů při čerpání. Některé aplikace proto vyžadují použití tlumičů [5].

U peristaltických pump je průtok kapaliny téměř lineárně závislý na rychlosti otáčení rotoru [5], díky tomu jsou peristaltická čerpadla vhodná pro dávkování. Pro přesné dávkování se také často používají čerpadla s kmitavým pohybem (obvykle pístové). U nich bývá dávkování přesnější, protože kolem pístů je menší únik kapaliny zpět než pod kladkami peristaltických čerpadel. Pístová čerpadla jsou však obecně mnohem nákladnější než peristaltická, protože obsahují více pohyblivých částí [6].

1.2. Teplota

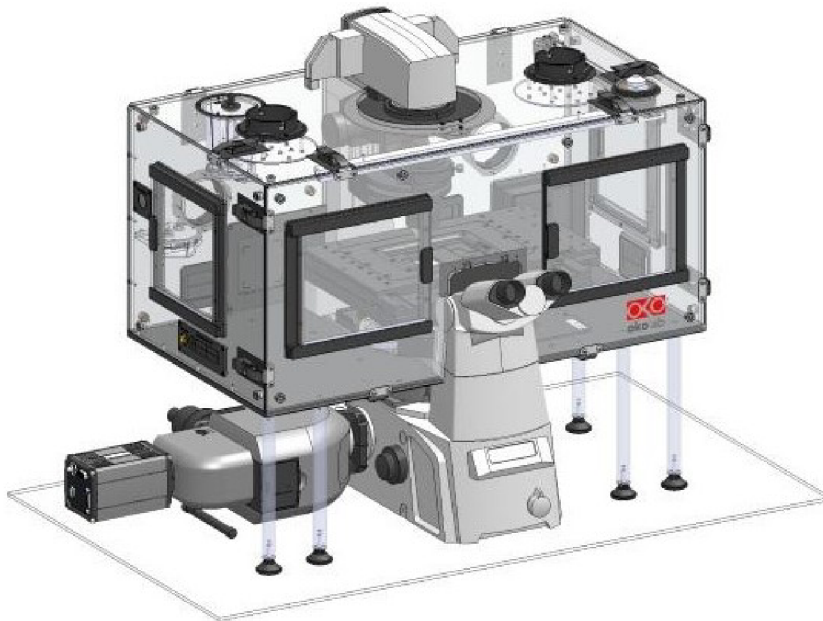
Pro práci s živými buňkami je teplota důležitou kultivační podmínkou, protože silně ovlivňuje chování a vitalitu buněk. Pro dlouhodobá pozorování je třeba udržet v okolí

vzorku fyziologickou teplotu (většinou 37°C), neboť při ní zůstanou buňky nejdéle vitální a jejich pozorování má tudíž největší výpovědní hodnotu o jejich chování v přirozeném prostředí. V některých biologických experimentech se sleduje reakce buněk na změny teploty. V těchto případech je potřeba použít zařízení, které je schopno s dostatečnou přesností rychle měnit teplotu vzorku. Teplota však má vliv nejen na buňky, ale také na mikroskop. Změny teploty způsobují tepelné roztahování a smršťování dílčích komponent mikroskopu, což při mikroskopování s vysokým rozlišením, může ovlivnit výsledné zobrazení. Nejzávažnější je roztahování a smršťování objektivu. Z těchto dvou důvodů (vitalita buněk a tepelná roztažnost) je pro většinu experimentů potřeba zajistit stabilní teplotu v okolí vzorku a objektivu.

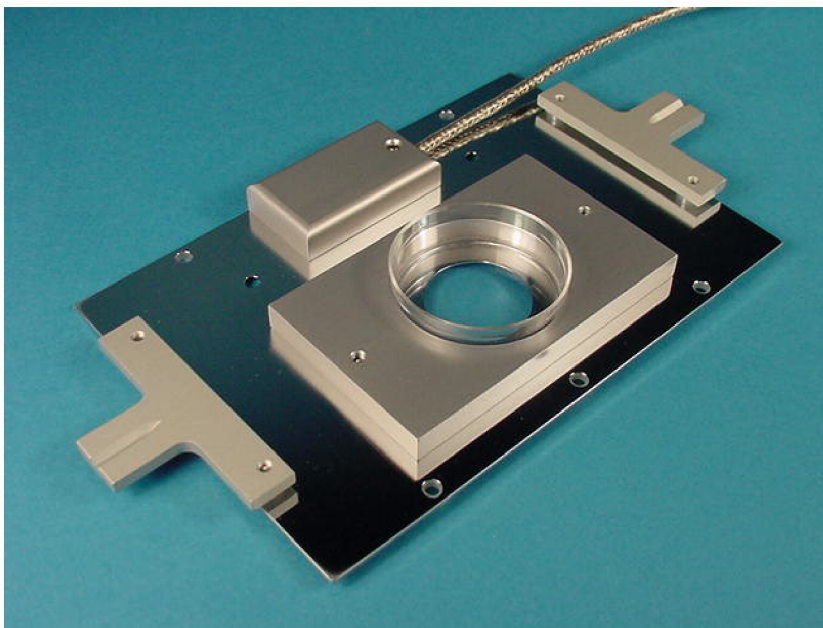
Pro temperování mikroskopu (tzn. ohřátí mikroskopu na požadovanou teplotu) se používá inkubační komora, která obklopuje většinu mikroskopu včetně vzorku (viz obr. 1.3). Kamera a případně další obslužná elektronika je umístěna mimo komoru, aby nebyla vystavena vysokým teplotám. Inkubační komora kromě teploty často umožňuje i regulaci vlhkosti vzduchu a koncentrace plynů [8]. Vyhřívání je realizováno pomocí elektrických odporů a nebo pomocí regulace teploty přiváděných plynů. Teplotní rozsah bývá 3 až 45°C nad teplotu okolí. Teploty nižší než je okolní teplota lze dosáhnout pouze instalováním klimatizace, což se děje velmi ojediněle. V porovnání s ostatními výhřevnými systémy jsou inkubační komory velmi stabilní v čase a jsou odolné proti víření vzduchu v místnosti. Na druhou stranu dosažení požadované teploty trvá dlouho (v řádu desítek minut až jednotek hodin). Nejsou proto vhodné pro experimenty se změnami teplot, ale naopak jsou ideální volbou pro dlouhodobá pozorování živých buněk. Inkubační komory jsou kompatibilní se všemi druhy vzorků, ale zase nemohou být přemístovány z mikroskopu na mikroskop. Komory jsou většinou vyráběny z průhledného plexiskla nebo polykarbonátu, pro experimenty citlivé na okolní světlo však existují i komory s černými panely na zatemnění [9].

Pokud biologické experimenty nevyžadují temperování mikroskopu, ale stačí pouze regulace teploty v oblasti vzorku, může se pro ohřev použít vyhříváný mikroskopový stolek nebo vyhříváná pozorovací komora. Všechna tato zařízení jsou vhodná pro experimenty se změnami teplot, neboť stabilizace teploty trvá maximálně v řádu jednotek minut. Vyhřívání stolky mají velký rozsah nastavitelných teplot, ty nejlepší stolky mají rozsah od -190°C až do 500°C [8]. Proto bývají používány pro experimenty s velmi vysokými nebo naopak nízkými teplotami. Pro biologické aplikace se používají stolky s rozsahem -5°C až 99°C . Vyhřívání stolky bývají ohřívány pomocí odporů nebo Peltierových článků, ty navíc umožňují i ochlazování stolku pod teplotu okolí. Kovové ohřáté části vyhřívání se dotýkají kultivačního zařízení, např. podložního sklíčka, a předávají mu teplo (viz obr. 1.4). Teplo se pak difuzí šíří po sklíčku až k vzorku a ohřívá ho. Nevýhodou vyhříváných stolků je, že kvůli velké vzdálenosti mezi vzorkem a ohříváčem může být vzorek ohříván nerovnoměrně [8]. Vyhřívání stolky jsou kompatibilní s různými typy kultivačních zařízení (misky, kanálky, podložní sklíčka atd.) a se vzpřímenými i invertovanými mikroskopy.

Další způsob jak ohřívát vzorky je použití Stage Top inkubátoru. Jak již název naznačuje, jedná se o inkubátory položené na mikroskopovém stolku. Stage Top inkubátory jsou alternativou k inkubačním komorám, protože stejně jako ony mohou regulovat kromě



Obrázek 1.3: Inkubační komora umístěna na invertovaném mikroskopu. Kamera na snímání je umístěna mimo inkubátor. Převzato z [10].



Obrázek 1.4: Vyhřívavý stolek na invertovaný mikroskop. Převzato z [11].

teploty také vlhkost vzduchu a koncentraci plynů [8], [9]. Výhodou oproti inkubačním komorám jsou menší rozměry inkubátoru a díky tomu i rychlejší změny teploty. Naopak jejich nevýhodou je, že na rozdíl od inkubačních komor, ohřívají pouze vzorek a netemperují mikroskop. Vyhřívání může být realizováno cirkulací vody ve stěnách inkubátoru (tzv. Water Jacket inkubátor [9]) nebo elektrickým vyhříváním skleněné základny a víčka inkubátoru [9], [12]. Pro lepší vedení tepla ze stěn inkubátoru ke komůrce se používají magnetické vložky. Kromě přenosu tepla tyto magnetické vložky také drží komůrku se vzorkem, aby se v inkubátoru nepohybovala. Teplotní rozsah Stage Top inkubátorů je

zhruba od teploty okolí až do 60°C , při použití Water Jacket inkubátoru je možné zchladit vzorek až 15°C pod teplotu okolí [9].



Obrázek 1.5: Stage Top inkubátor H301-K-FRAME s dvěma petriho miskami uchycenými do magnetické vložky. Převzato z [9].

Kromě vyhřívání stolků a Stage Top inkubátorů je možné pro ohřev vzorku použít vyhřívané komůrky nebo čipy. Jedná se však o méně frekventované řešení a na trhu je těchto zařízení pouze několik. Konkrétně komůrky Delta T System a Focht Chamber System jsou popsány v části 2.4 a systém Cherry Temp s vyhříváním čipem je popsán v části 2.2. Díky tomu, že v těchto zařízeních se ohřívá pouze malý objem uvnitř komůrky nebo čipu, jsou změny teploty opravdu rychlé (v řádu sekund), což je jejich hlavní předností.

Pokud na mikroskopu není nainstalovaná inkubační komora a je používáno některé z výše popsaných zařízení pro ohřev vzorku, může se stát, že studený objektiv bude ze vzorku odvádět teplo a bude tak narušena teplotní rovnováha vzorku. Tento negativní jev nastává obzvláště při použití imerzního oleje, který funguje jako tepelný most mezi teplým vzorkem a studeným objektivem. Pro eliminaci tohoto jevu se používají vyhřívání límce na objektiv (viz obr. 1.6). Límce mohou být vyhřívány elektricky a nebo cirkulující kapalinou. Pro lepší regulaci teploty obsahují elektricky vyhřívání límce často tepelný senzor, který bere v potaz také ohřátí objektivu procházejícím světlem. Tato vlastnost je obzvláště užitečná při dlouhém mikroskopování. Límce s cirkulující kapalinou jsou stabilnější a přesnější než elektrické límce a v případě potřeby mohou objektiv ochladit pod teplotu okolí. Tyto límce mají tvar kovového dutého prstence, do kterého je čerpána ohřátá kapalina. Správné používání límce není úplně jednoduché, protože je potřeba synchronizovat vyhřívání límce a druhého zařízení pro ohřev vzorku tak, aby ve vzorku nevznikali teplotní gradienty. To je obzvláště náročné při experimentech se změnami teploty [8].



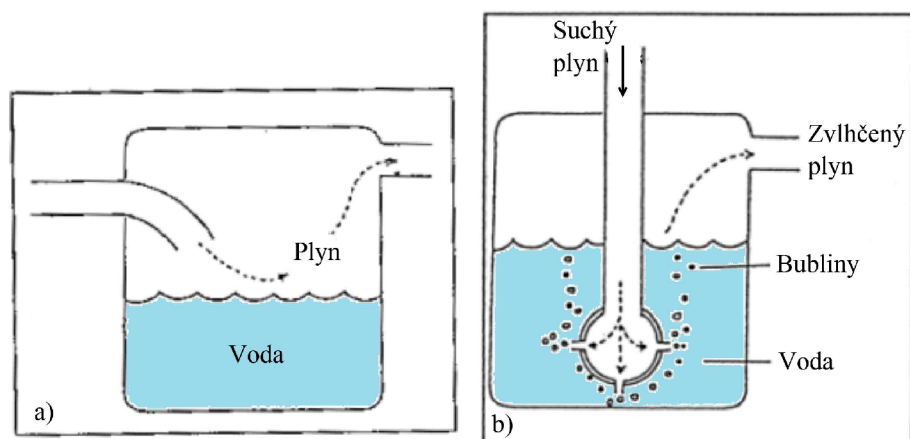
Obrázek 1.6: Elektricky vyhřívaný límec na objektiv. Převzato z [9].

1.3. Atmosféra

V atmosféře kultivačního zařízení se regulují dva parametry - vlhkost vzduchu a koncentrace plynů (především CO_2). Vlhkost atmosféry ovlivňuje rychlost vypařování vody z média. Čím je vlhkost nižší, tím je vypařování rychlejší. Odpařování vody z média je nežádoucí jev, protože s ubývající vodou se zvyšují koncentrace rozpuštěných solí. Aby bylo vypařování co nejpomalejší, požaduje se v kultivačních zařízeních vysoká relativní vlhkost, obvykle kolem 90% nebo vyšší [2]. Pro dosažení požadované vlhkosti se používají zvlhčovače. Zvlhčovače pro kultivaci buněk můžeme rozdělit podle toho, jestli plyn ve zvlhčovači prochází kolem vody a nebo jestli skrz vodu probublává (viz obr. 1.7). Za nejjednodušší zvlhčovač můžeme považovat nádobu s vodou umístěnou v blízkosti kultivovaných buněk. Jak se voda z nádoby odpařuje, zvlhčuje atmosféru nad médiem. Ve zvlhčovačích, kde plyn prochází kolem vody, může být vlhčení zvýšeno použitím knotů nebo membrán, ze kterých se voda lépe odpařuje než z volné hladiny. Jiné dělení zvlhčovačů je na vyhřívané a nevyhřívané. Při vyšší teplotě je vypařování rychlejší a tedy výsledná vlhkost atmosféry vyšší. Regulací teploty vody a nebo přiváděného plynu lze měnit výslednou vlhkost.

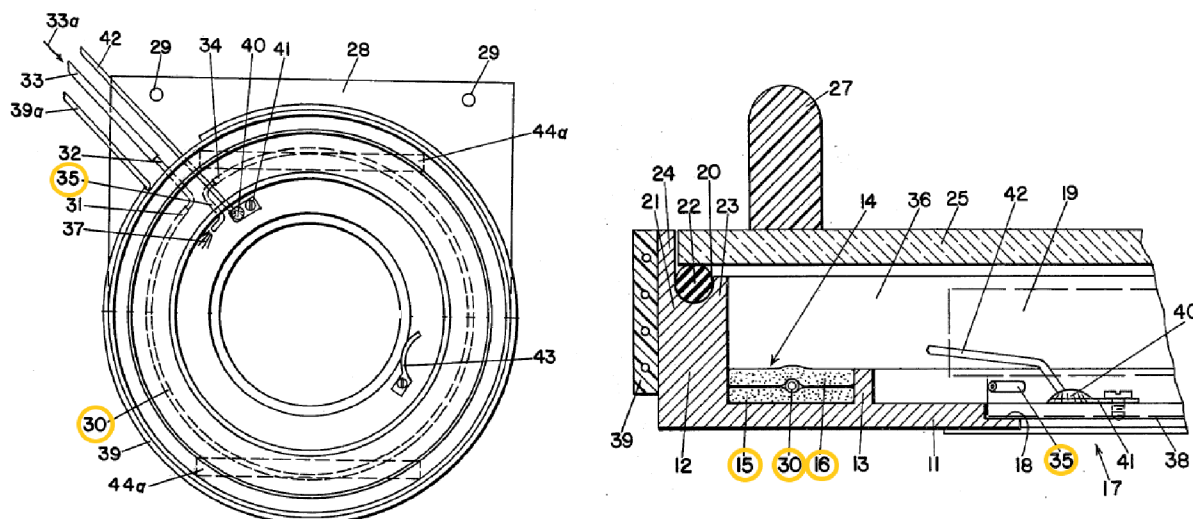
V probublávacích zvlhčovačích je plyn trubičkou přiveden do určité hloubky pod hladinu vody a zde se uvolní do vody skrz porézní materiál. Jak bubliny vzduchu stoupají k hladině, vypařuje se do bublin vodní pára. Výsledná vlhkost atmosféry je závislá na teplotě vody, tlaku v nádobě, průtoku plynu a hloubce, do které je plyn přiváděn [14]. Základní probublávací zvlhčovače se skládají pouze z nádoby s vodou, porézního materiálu a přiváděcí trubky. Pokročilé probublávací zvlhčovače obsahují navíc vyhřívání a jsou elektronicky řízené s využitím zpětné vazby ze senzorů [15].

Kromě výše zmíněných typů zvlhčovačů, které jsou nejčastější, existují i další méně časté designy. Jeden z alternativních způsobů zvlhčování je, že plyn prochází perforovanou trubicí obklopenou houbovitém vlhkým materiálem. Čím je perforovaná trubice delší, tím bude výsledná relativní vlhkost plynu vyšší. Tento druh zvlhčovače může být umístěn



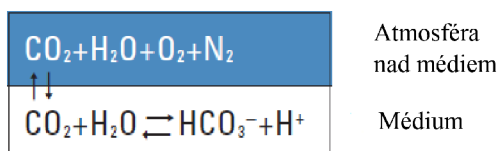
Obrázek 1.7: Zvlhčovač, ve kterém plyn a) fouká nad vodou, b) probublává skrz vodu. Převzato a upraveno z [13].

přímo do pozorovací komůrky, jak tomu je u patentovaného inkubátoru pro světelnou mikroskopii [16] (viz obr. 1.8). Pokud je však zvlhčovač uzavřen v komůrce, nelze v průběhu pozorování doplňovat na vlhčící materiál vodu, čímž je omezena doba pozorování.



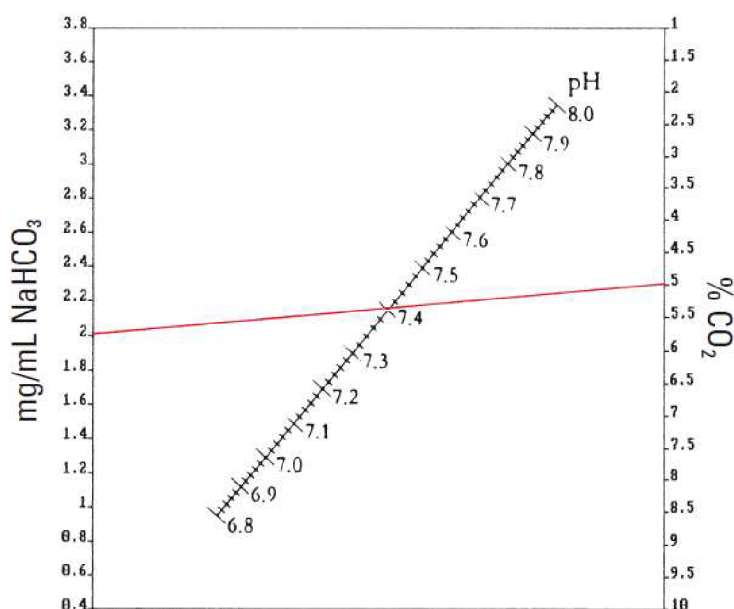
Obrázek 1.8: Inkubátor pro světelnou mikroskopii se zabudovaným zvlhčovačem. Plyn je prochází perforovanou trubicí (30), která vede kolem dokola inkubátoru a nakonec ústí do pozorovací komory (35). Trubice je obklopená houbovým vlhkým materiálem (15,16). Převzato a upraveno z [16].

Dalším sledovaným parametrem atmosféry je její složení, zejména pak koncentrace CO_2 . Během kultivace buněk může docházet k výměně mezi plynným CO_2 v atmosféře a CO_2 v médiu. Směr a rychlost výměny závisí na množství CO_2 v obou prostředích (viz obr. 1.9). Pokud je koncentrace CO_2 v atmosféře příliš nízká, uniká CO_2 z média do atmosféry a dochází k alkalizaci média (zvýšení pH). Proti tomuto zvyšování pH působí dýchání buněk. Buňky totiž při dýchání uvolňují do média CO_2 , čímž médium okyselují (snižují pH).



Obrázek 1.9: Výměna plyného CO_2 v atmosféře a CO_2 rozpuštěného v médiu s biokarbonátovým pufrům NaHCO_3 . Převzato a upraveno z [17].

Pro udržení stabilního pH média se do kultivačních zařízení přidávají pufrы, velmi často se používá bikarbonátový pufr [2]. Pufrы jsou látky schopné po přidání zásady nebo kyseliny udržovat pH roztoku na potřebné hodnotě, dokud není vyčerpána jejich tlumivá kapacita. Správné množství CO_2 v atmosféře se nastavuje podle množství použitého pufru. Vhodné koncentrace lze odhadnout z obrázku 1.10. Na pravé svislé ose se zvolí koncentrace CO_2 v atmosféře a na levé svislé ose se zvolí koncentrace bikarbonátového pufru. Tyto dvě hodnoty se proloží přímkou a příčka protne osu pH v hodnotě, která odpovídá pH média.



Obrázek 1.10: Nomogram pro odhad koncentrací bikarbonátového pufru NaHCO_3 , oxidu uhličitého CO_2 a pH hodnot podle Henderson-Hasselbalchovy rovnice. Červená čára odpovídá standardním podmínkám při 2 mg/ml NaHCO_3 a 5% CO_2 . Převzato z [17].

Při kultivaci se většinou používají 2 mg bikarbonátového pufru na 1 ml média při koncentraci 5% plyného CO_2 v atmosféře [17]. Je však možné buňky kultivovat i za jiných podmínek. V Laboratoři experimentální biofotoniky se většinou pozoruje menší počet buněk, takže buňky svým dýcháním okyselují médium jen málo a hrozí alkalizace. Proto se do média přidává menší množství pufru, jen 1 mg/ml bikarbonátového pufru. Tomu podle obrázku 1.10 odpovídá pro fyziologické pH 7,4 koncentrace CO_2 3%. Někdy je také používán organický pufr HEPES o koncentraci 20 mM, který není závislý na množství CO_2 v atmosféře.

2. Komerčně dostupné systémy pro řízení kultivačních podmínek

V současné době je na trhu mnoho nástrojů, které zlepšují a zjednodušují řízení kultivačních podmínek během mikroskopování. Prodávají se nástroje, které zákazník může zakomponovat do svých systémů. Tyto dílčí komponenty jsou např. senzory tlaku, mikrofluidické pumpy, ventily atd. Několik komerčně dostupných nástrojů bylo zakomponováno do vlastního systému, který je popsán v praktické části práce 5.

Mnoho firem však také nabízí kompletní systémy, které automatizovaně a precizně plní určitou funkci. V této části práce budou popsány vybrané komerční systémy, jejichž funkcí je řízení kultivačních podmínek při mikroskopování živých buněk. Některé firmy (např. Ibidi nebo Cherry Biotech) nabízejí systémy, které řídí a kontrolují jen jednu kultivační podmínku. To znamená, že pokud zákazník chce například řídit teplotu, atmosféru a perfuzi, musí si koupit tři samostatné systémy, které jsou však většinou kompatibilní, nakupuje-li u jedné firmy. Na trhu jsou však také kombinované systémy, které zajišťují více kultivačních podmínek najednou. Například komůrka Focht Chamber System od firmy Biotech, zajišťuje uživatelsky definovanou výměnu média a regulaci teploty [18]. Nejkomplexnější systémy, které zajišťují mnoho kultivačních podmínek po velmi dlouhý čas, se nazývají Organ-On-Chip (např. CubiX Mark I od firmy Cherry Biotech [8] nebo Organ-On-Chip Platform od Fluigent [19]).

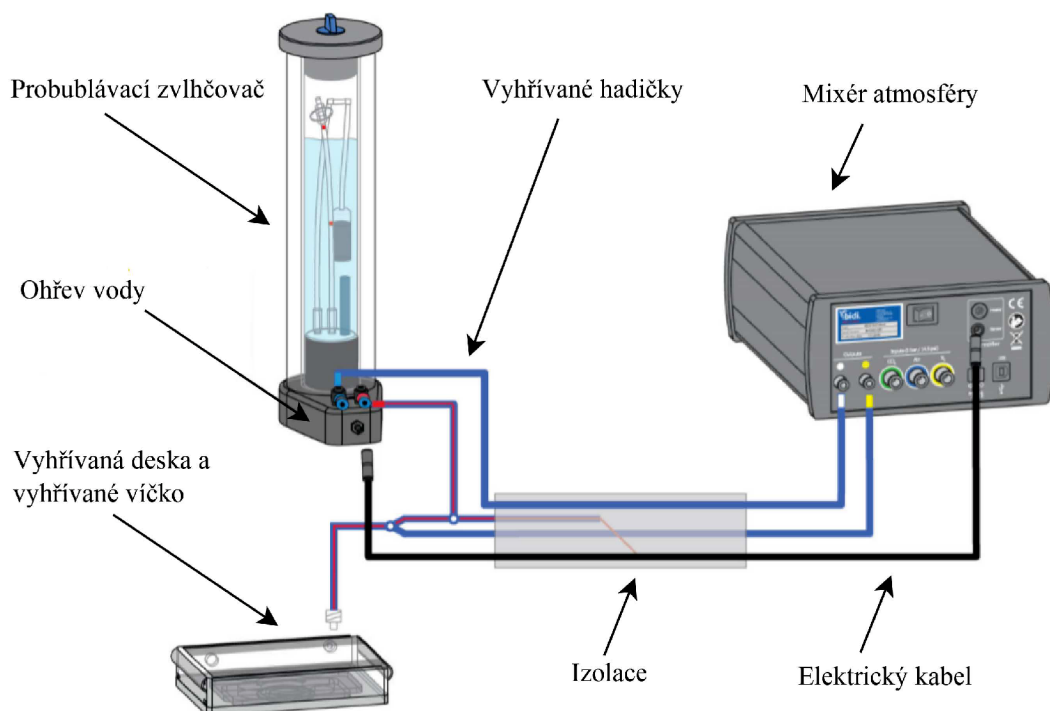
2.1. Ibidi

Velkým výrobcem laboratorních potřeb pro buněčnou analýzu a mikroskopování je firma Ibidi [15]. Pro vyhřívání pozorovacích komůrek nabízí vyhřívací systém Ibidi Heating System, sestávající z kontroloru teploty (Temperature Controller), vyhřívané desky (Heating Plate), vyhřívaného víčka (Heating Lid) (není nezbytné) a případných vyhřívaných vložek (Heating Insert) pro různé, misky a sklíčka.

K vyhřívacímu systému lze připojit systém pro kontrolu atmosféry Ibidi Gas Incubation System a oba systémy dohromady se nazývají Ibidi Stage Top Incubator (viz obr. 2.1). Systém pro kontrolu atmosféry obsahuje sloupcový probublávací zvlhčovač vzduchu, vyhřívané hadičky a mixér atmosféry pro CO₂ a případně i pro O₂.

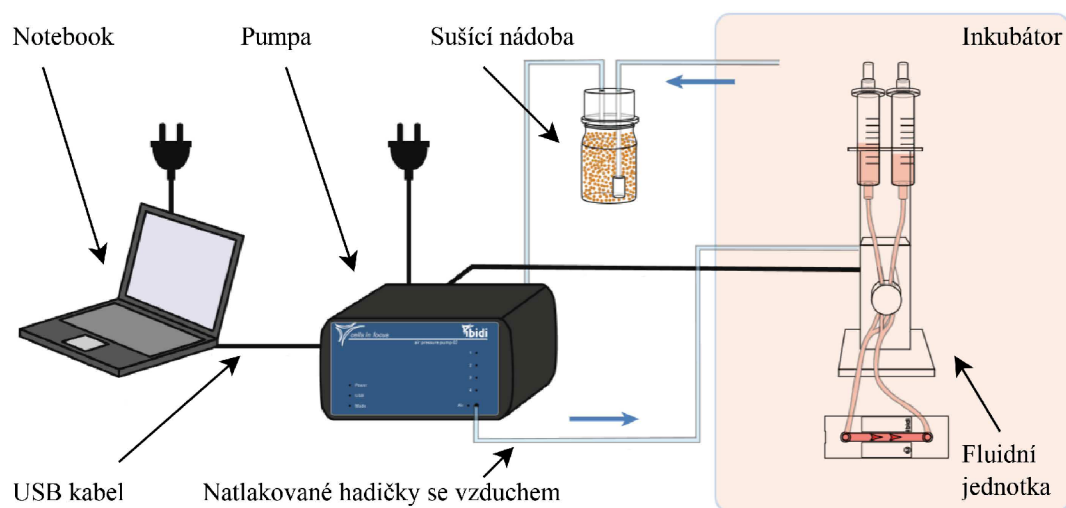
Pro experimenty s proudícím médiem nabízí firma Ibidi perfuzní systémy Ibidi Pump System. Systém obsahuje pumpu, notebook se softwarem PumpControl, perfuzní sadu (s nádržemi a hadičkami) a fluidní jednotku, která drží nádrže s médiem a přepíná mezi nimi pomocí elektronicky řízených ventilů. Perfuzní sada se pomocí Luer konektorů připojuje k průtokovým komůrkám. Ibidi Pump System je kompatibilní s Ibidi Gas Incubation i s Ibidi Heating System [15].

Pro vyhřívání se fluidní jednotka s nádržemi s médiem umístí do inkubátoru, který je blízko mikroskopu, a průtoková komůrka se vloží do speciální vyhřívané vložky pro perfuzní experimenty. Hadičky a elektrický kabel jsou přivedeny skrz zadní otvor v inku-



Obrázek 2.1: Schéma zapojení systému Ibidi Stage Top Incubator. Vyhřívaná deska a vyhřívané víčko je součástí Ibidi Heating System. Ostatní díly patří k Ibidi Gas Incubation System. Převzato a upraveno z [20].

bátoru. V případě, že v inkubátoru žádný zadní otvor není, tak jsou vedeny skrz dveře inkubátoru. Většina inkubátorů má ve dveřích gumové těsnění, které je dostatečně měkké, aby hadičky a kabel nepoškodily (viz obr. 2.2).



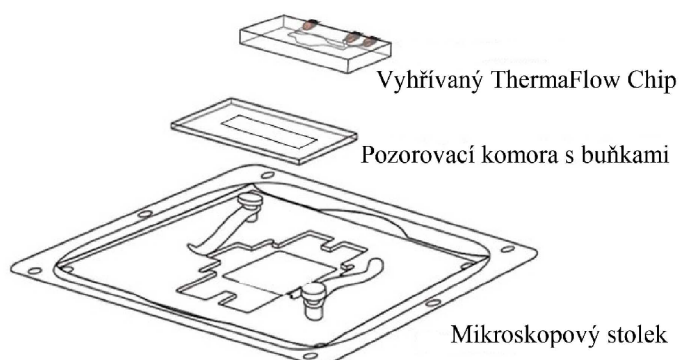
Obrázek 2.2: Schéma perfuzního systému Ibidi Pump System s fluidní jednotkou umístěnou do inkubátoru. Převzato a upraveno z [21].

2.2. Cherry Biotech

Firma Cherry Biotech nabízí tři produkty: Cherry Temp pro rychlé měnění teploty, Perfusion Pack pro perfuzi a přepínání média a CubiX pro dlouhodobou kultivaci buněk a tkání [8].

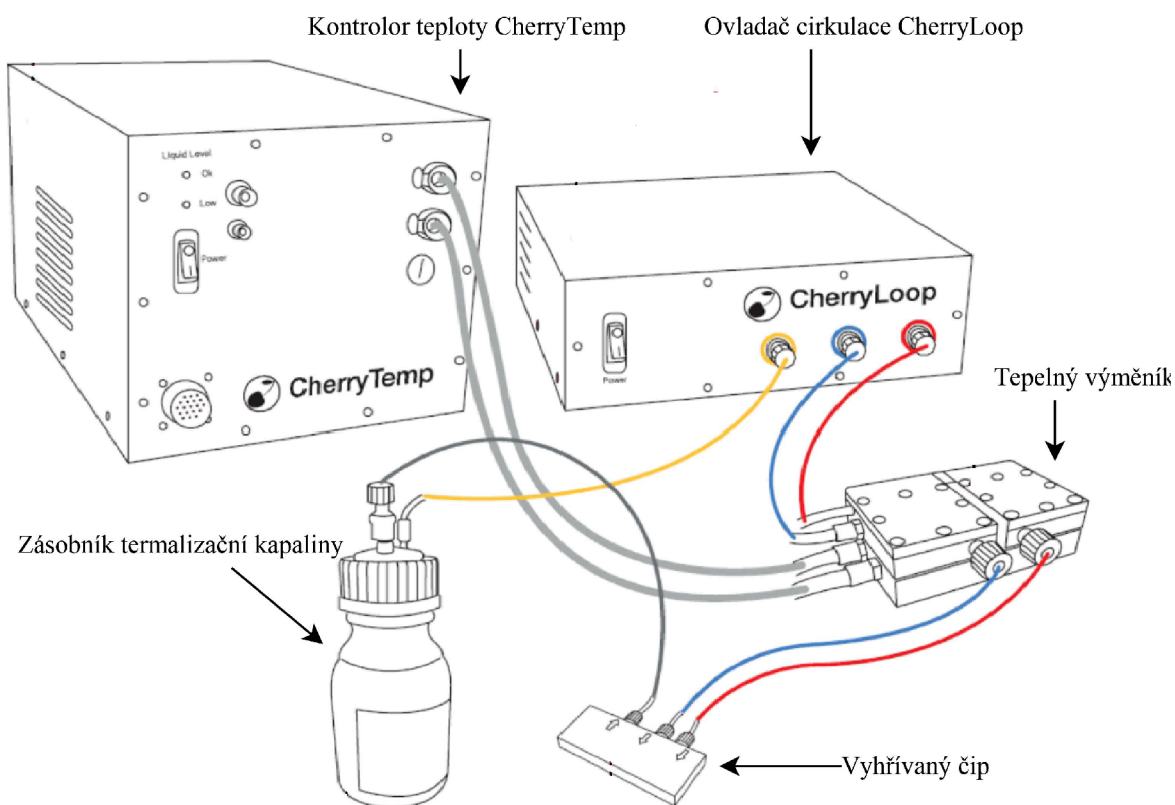
Cherry Temp

Systém Cherry Temp slouží k rychlým změnám teploty média během mikroskopování v rozsahu 5 – 45°C s přesností $\pm 0,1^\circ\text{C}$. Ústřední součástí systému je vyhřívaný čip, který je přiložen na sklíčko s buňkami (viz obr. 2.3). Změna teploty vyhřívaného čipu je realizována pomocí termalizační kapaliny, která je ohřívána nebo chlazena v tepelném výměníku s Peltierovými články. Tepelný výměník je řízen PID kontrolorem CherryBox. Cirkulace termalizační kapaliny mezi zásobníkem, tepelným výměníkem a vyhřívaným čipem je řízena ovladačem CherryLoop (viz obr. 2.4).

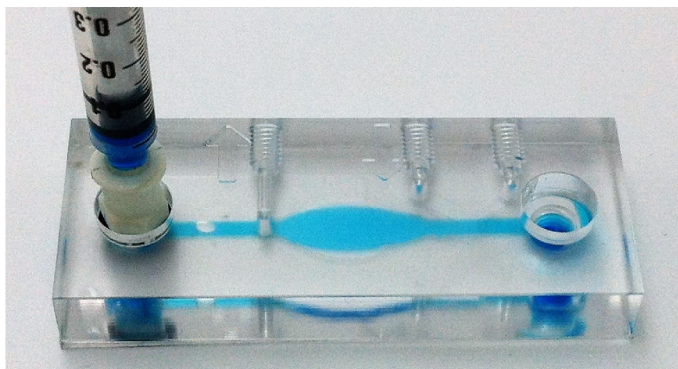


Obrázek 2.3: Vyhřívaný čip, který je součástí systému Cherry Temp, se přikládá na komoru s pozorovanými buňkami a komora se uchyť k mikroskopickému stolku. Převzato a upraveno z [8].

Systém Cherry Temp může být vybaven třemi druhy vyhřívaných čipů – Therma Chip, ThermoFlow Chip a Therma35 Chip. První z nich, Therma Chip, je součástí standardní výbavy Cherry Temp. Druhý čip, ThermoFlow Chip, je podobný jako základní Therma Chip, ale obsahuje navíc průtokový kanálek a vstupní a výstupní otvor. ThermoFlow Chip tedy umožňuje kromě změny teploty také výměnu média a přidávání činidel v průběhu mikroskopování (viz obrázek 2.5). Výměna média může být realizována buď ručně pomocí stříkačky a nebo automaticky s využitím perfuzního systému. Oba dva popsané čipy mají však malý objem komůrky s buňkami, a nejsou proto vhodné pro dlouhodobé mikroskopování živých buněk. Pro dlouhodobé experimenty je vhodné použít čip Therma35 Chip, který je kompatibilní se standardními 35 mm Petriho miskami. Therma35 Chip je však pro jednorázové použití, na rozdíl od Therma Chip a ThermoFlow Chip, které mají životnost 2 měsíce.



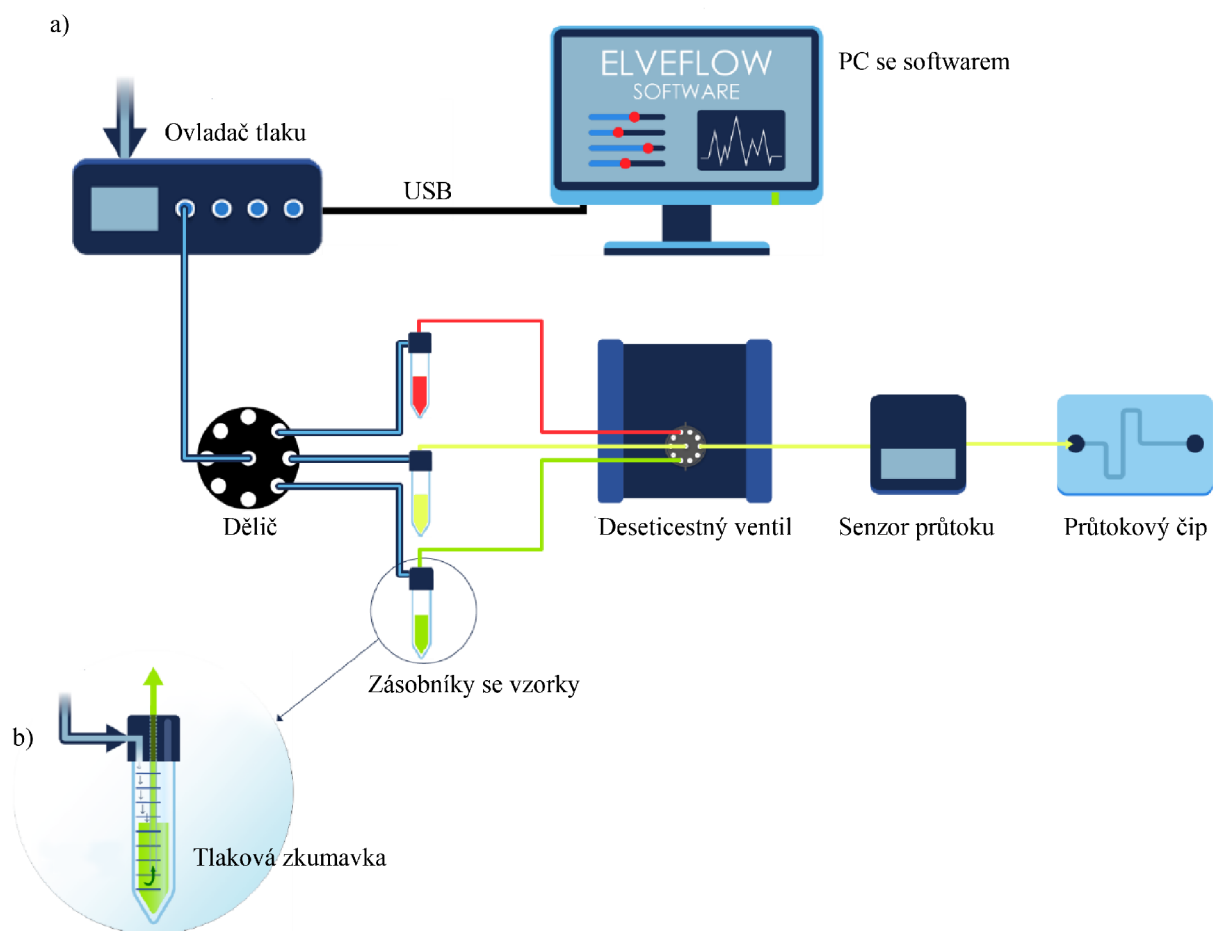
Obrázek 2.4: Schéma systému Cherry Temp. Převzato a upraveno z [8].



Obrázek 2.5: Průtokový vyhřívání čip ThermoFlow. Převzato a upraveno z [8].

Perfusion Pack

Systém Perfusion Pack vznikl ve spolupráci firmy Cherry Biotech a firmy ElveFlow [22], která se zabývá vývojem mikrofluidických zařízení. Perfusion Pack umožňuje vytvořit stabilní nebo pulzující proudění v libovolné průtokové komůrce nebo čipu. Průtok lze nastavit v rozsahu od 0,1 do 5000 $\mu\text{l}/\text{min}$. Díky elektronicky ovládanému ventilu je možné přepínat mezi až 10 zásobníky s roztoky. Systém obsahuje ovladač tlaku a průtoku, elektronicky ovládaný ventil, senzor průtoku, zásobníky pro médium, hadičky, konektory a software (viz obr. 2.6).



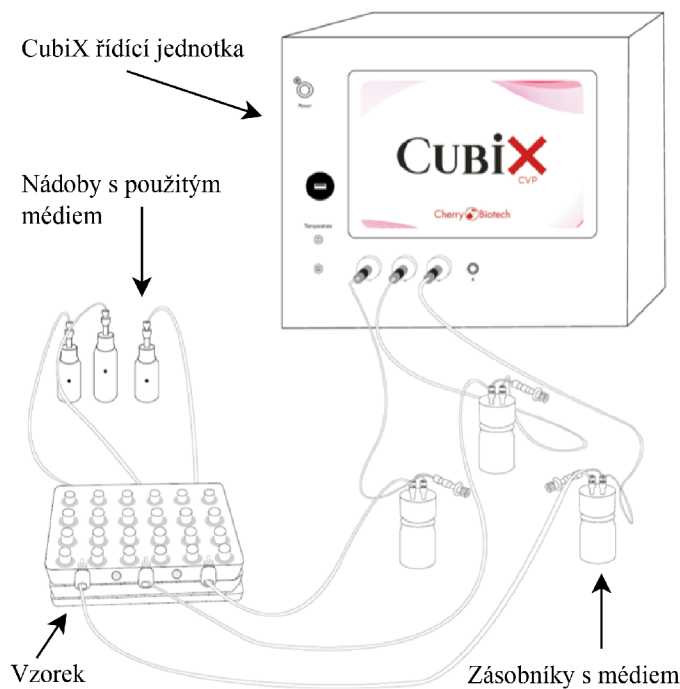
Obrázek 2.6: a) Schéma systému Perfusion Pack. b) Detail zásobníku s médiem. Dávkování média je realizováno pomocí přetlaku v tlakových zkumavkách. Převzato a upraveno z [22].

CubiX Mark I

Nejkomplexnější systém od firmy Cherry Biotech je systém CubiX Mark I. Slouží k napodobování fyziologických a patologických podmínek pro buněčné a tkáňové kultury (viz obr. 2.7). Umožňuje perfuzi média v kontinuálním i pulzním režimu, řízení atmosféry a teploty. V atmosféře lze nastavit koncentraci CO_2 , O_2 a N_2 . Na zakázku lze zajistit i řízení koncentrace dalších plynů (H_2 , NO_2 atd.) Buňky nebo tkáně mohou být kultivovány v libovolných miskách nebo čípech a mikroskopovány na jakémkoli invertovaném mikroskopu. Řídící jednotka obsahuje vlastní software, takže k obsluze není potřeba počítač. CubiX také umožňuje shromažďování použitých médií pro další analýzu.

2.3. Fluigent

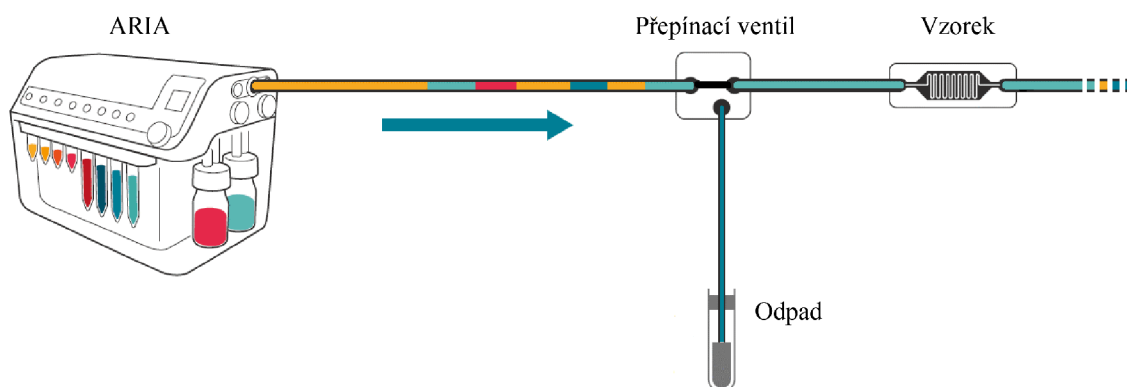
Firma Fluigent vyvíjí nástroje pro různé mikrofluidické a nanofluidické aplikace. Nabízí mikrofluidické senzory průtoku a tlaku, mikrofluidické ventily apod. Nabízí také několik kompletních systémů, např. systém Aria pro dávkování roztoků a systém Organ-On-Chip Platform [19].



Obrázek 2.7: Schéma systému CubiX Mark I. Převzato a upraveno z [8].

Aria

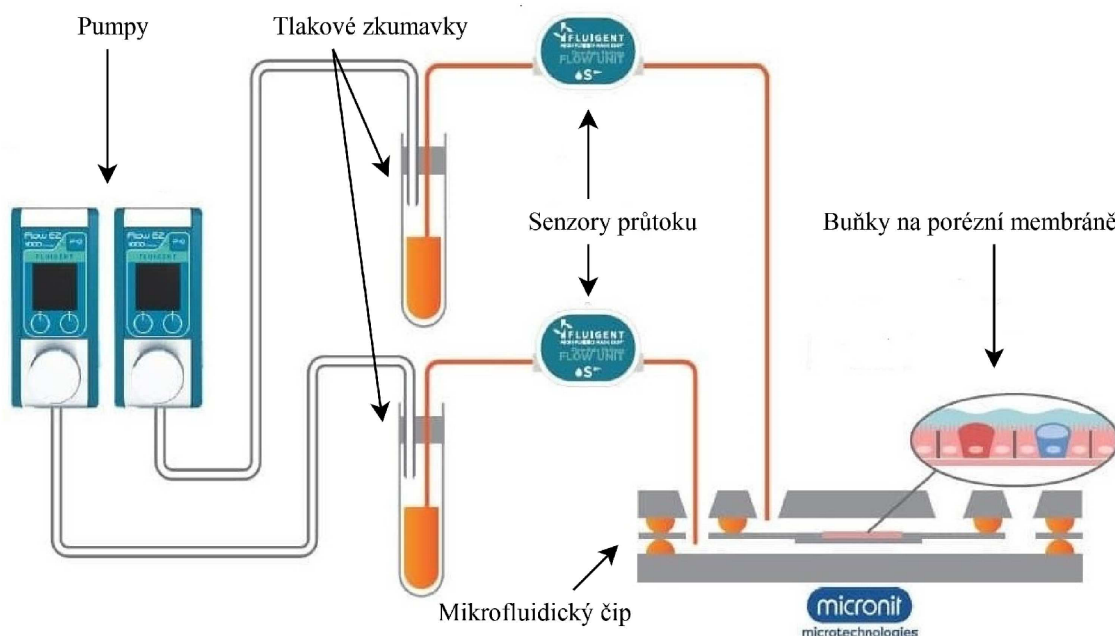
Aria je mikrofluidické zařízení pro automatické dávkování roztoků podle časového protokolu. Zařízení umožňuje dávkování až 10 roztoků a je kompatibilní s libovolnými komůrkami nebo mikrofluidickými čipy. Průtok lze nastavit v rozsahu od $40 \mu\text{l}/\text{min}$ do $1 \text{ ml}/\text{min}$. Automatizace umožňuje dosáhnout větší reprodukovatelnosti experimentů, omezit kontaminaci z manuálního pipetování a ušetřit čas. Aria obsahuje ovladač tlaku, senzor průtoku, software a rotační ventil pro deset vstupů a jeden výstup (viz obr. 2.8). Díky Aria softwaru je možné nastavit časování, průtok a objem vstříknutého roztoku.



Obrázek 2.8: Schéma dávkovacího systému Aria. Převzato a upraveno z [19].

Organ-On-Chip Platform

Fluigent ve spolupráci s firmou Micronit[23] vytvořil systém Organ-on-Chip Platform, který slouží k dlouhodobému napodobování fyziologických podmínek. Systém umožňuje výměnu kapalin a plynů a zajišťuje jejich stabilní tlak a průtok. Organ-on-Chip se skládá z těchto mikrofluidických komponent: mikrofluidická pumpa Flow EZ, tlaková zkumavka Fluiwell, senzor průtoku Flow Units, čip Micronit Chip a držák čipu (viz obr. 2.9). Systém Organ-On-Chip lze ještě doplnit o vícechodý ventil pro přepínání média z více zásobníků.



Obrázek 2.9: Schéma systému Organ-On-Chip Platform. Převzato a upraveno z [19].

2.4. Bioptechs

Firma Bioptechs [18] vyvíjí systémy a příslušenství pro řízení podmínek pro mikroskopii živých buněk, např. ohřívač objektivu, peristaltické pumpy apod. Zde budou popsány jen vyhřívané komůrky Delta T System a Focht Chamber System.

Delta T System

Delta T System je komplexní systém pro řízení podmínek pro dlouhodobé mikroskopování buněčných kultur bez průtoku média. Delta T System obsahuje regulátor teploty Delta T, vyhřívané víčko, víčko s krycím sklíčkem, čtyři kultivační válce a deset Delta T misek s tloušťkou dna 0,17 mm (viz obr. 2.10). K dispozici je i další volitelné příslušenství. Adaptér pro připojení k mikroskopu je nutné objednat samostatně.

Systém Delta T má ojedinělý způsob vyhřívání. Na rozdíl od jiných systémů není vyhřívání realizováno prostřednictvím vyhřívaného stolku, který předává teplo misce se



Obrázek 2.10: Komponenty Delta T Systemu. Převzato a upraveno z [18].

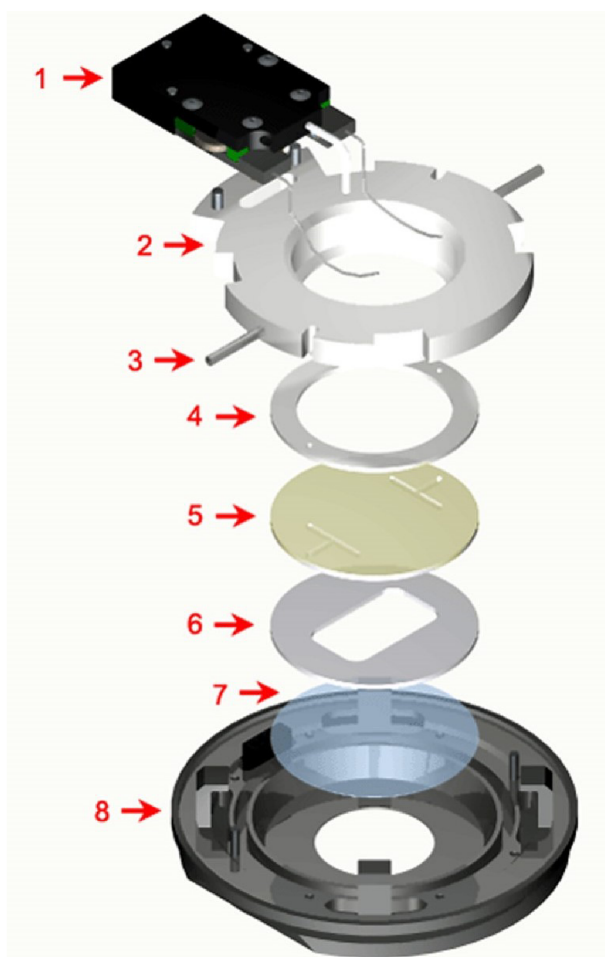
vzorky, ale vyhřívá se přímo miska. Misky mají na spodní straně elektricky vodivý a opticky transparentní povlak z oxidu india a cínu (ITO povlak), který prochází-li jím elektrický proud, přímo zahřívá misku s buňkami. Standardní rozsah vyhřívání je od teploty okolí až do 50°C. Na zakázku lze zajistit i větší rozsah teplot.

Pro přikrytí Delta T misek jsou k dispozici dvě víčka - vyhřívané a s krycím sklíčkem. Vyhřívané víčko má stejně jako Delta T miska ITO povlak a obsahuje port pro přívod atmosféry. Víčko s krycím sklíčkem má uprostřed krycí sklíčko o tloušťce 0,5 mm a průměru 22 mm, které je umístěno přímo na rozhraní média a atmosféry. Rozhraní je díky tomu opticky rovné, je omezeno vypařování a pohyb média. Toto víčko je proto vhodné zejména pro transmisní mikroskopické techniky měřící kontrast. Víčko s krycím sklíčkem je nabízeno ve variantách s porty pro výměnu atmosféry i bez nich. Systém Delta T je otevřený, to znamená, že i při použití víček stále dochází k výměně atmosféry mezi komůrkou a okolím, nicméně víčko s krycím sklíčkem omezuje výměnu atmosféry s okolím více než vyhřívané víčko.

Pro školní výuku nabízí Bioprotechs zjednodušenou verzi Delta T Systemu označenou jako EDU. Ta umožňuje nastavení teploty jen na diskrétní hodnoty 28, 30 37 a 41 °C. Na rozdíl od Delta T systému má také jen jednoduché víčko, které není vyhřívané, nepřiléhá ke hladině a nemá porty pro výměnu atmosféry. Verze EDU již obsahuje univerzální stolní adaptér.

Focht Chamber System (FCS2 a FCS3)

Jak bylo zmíněno výše, komůrky Delta T nezajišťuje výměnu média. Pro buněčné experimenty s proudícím médiem nabízí Bioptechs průtokové komůrky Focht Chamber System (FCS). Tyto komůrky využívají několik patentovaných technologií firmy Bioptechs [18]. Jeden z patentů je perfuze skrz mikro-akvadukty (mikrokanálky), které zajišťují téměř laminární proudění. Systém tak zajišťuje uživatelsky definovatelné laminární proudění a také přesnou regulaci teploty. FCS je plně kompatibilní se všemi mikroskopickými režimy a neovlivňuje Köhlerovo osvětlení. Verze systému FCS pro invertovaný mikroskop se nazývá FCS2 a pro vzpřímený mikroskop se nazývá FCS3. Systém obsahuje FCS komoru, regulátor teploty, 5 sklíček s mikro-akvadukty, 100 krycích sklíček #1,5 x 40 mm German Desag26 a 30 kusů těsnění různých tvarů (viz obr. 2.11). Adaptér pro uchycení k mikroskopu a peristaltické pumpy pro čerpání média a atmosféry je nutné zakoupit zvlášť.

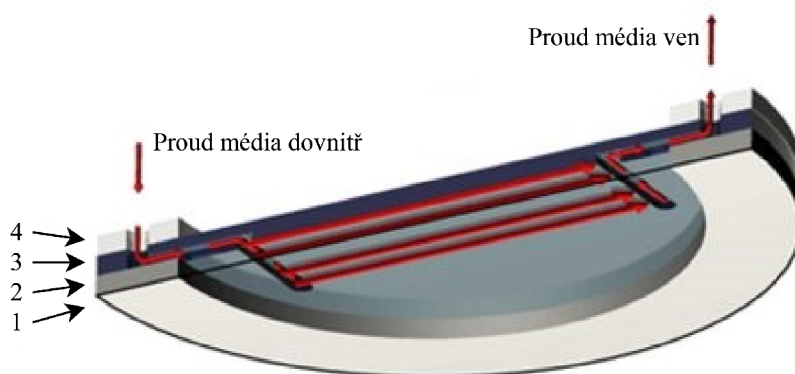


Obrázek 2.11: Rozložené schéma komůrky FCS2: 1. elektronika, 2. horní díl komůrky, 3. perfuzní hadičky, 4. horní těsnění, 5. sklíčko s mikro-akvadukty, 6. tvarované dolní těsnění, 7. krycí sklíčko a 8. spodní díl komůrky. Převzato z [18].

Buňky jsou nasazeny na krycí sklíčko o průměru 40 mm. Toto sklíčko je poté zakomponováno do průtokové komůrky, jejíž tvar je definován uživatelem díky volbě tvaru těsnění.

Komůrka se poté připevní na adaptér mikroskopu. Médium se přivádí portem na jedné straně komůrky a odchází portem na druhé straně. Charakteristiky proudu mohou být modifikovány výběrem tvaru těsnění. Vyhřívání je realizováno jednak prostřednictvím kovového rámu kolem komůrky a jednak skrz ITO povlak, podobně jako tomu bylo u Delta T Systému. Dohromady umožňují rychlou obnovu požadované teploty (v řádu jednotek sekund) po teplotních fluktuacích způsobených prouděním média. Rozsah nastavitelných teplot je od teploty okolního prostředí až do 50°C s přesností $\pm 0,2^\circ\text{C}$ bez proti vzduchové clony.

Tvarované těsnění je vyrobeno ze silikonu a je umístěno mezi sklíčkem s mikro-akvadukty a krycím sklíčkem s buňkami. Tloušťka těsnění je 50 μm až 1 mm. Uživatel si může vybrat některé z těsnění dodávaných se systémem nebo si může vyrobit vlastní. Dodávaná těsnění mají tvar různých kanálků nebo dutin. Mikro-akvadukty jsou vyryté do vnitřní strany harního sklíčka a mají tvar dvou „T“ (viz obr. 2.12). Mikro-akvadukty pomáhají médiu hledat cestu nejmenšího odporu a proudění se tak stává téměř laminárním.



Obrázek 2.12: Schéma proudění skrz mikro-akvadukty v systému FCS: 1. krycí sklíčko, 2. tvarované dolní těsnění, 3. sklíčko s mikroskvadukty a 4. horní těsnění. Převzato a upraveno z [18].

3. Mikroskopie živých buněk v Laboratoři experimentální biofotoniky

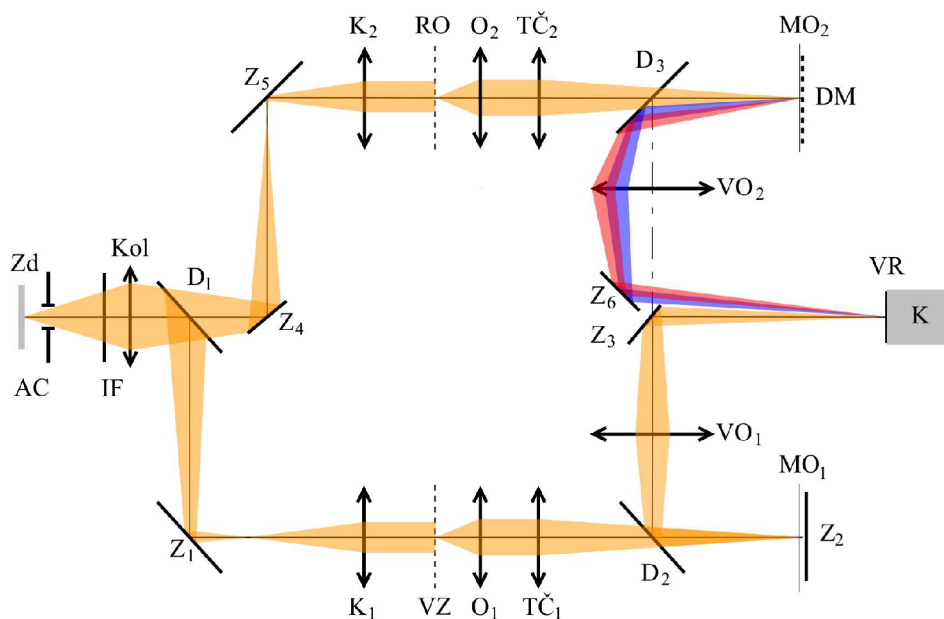
Laboratoř experimentální biofotoniky na Ústavu fyzikálního inženýrství VUT v Brně se zabývá vývojem pokročilé světelné mikroskopie, zejména se zaměřuje na holografickou mikroskopii. V laboratoři byl vyvinut a zkonstruován Koherencí řízený holografický mikroskop (CCHM z anglického názvu Coherence-controlled holographic microscope). Zobrazení tímto mikroskopem má vysoké rozlišení [24], umožňuje sledovat rychle se měnící děje a nevyžaduje barvení vzorku. Díky těmto vlastnostem nachází uplatnění především v biologii při pozorování změn v živých buňkách [25]. V Laboratoři experimentální biofotoniky se proto věnují biologickým aplikacím mikroskopie v oblastech buněčné biologie, rakoviny a neurovědy [26].

3.1. Koherencí řízený holografický mikroskop

CCHM je holografický mikroskop, u kterého lze řídit míru koherence osvětlení. Holografické mikroskopy jsou zařízení, která využívají mimoosové (off-axis) interference světla z předmětové a referenční větve. Interferenční úhel má takovou velikost, že vznikající interferogram je hologramem, tj. umožňuje z jednoho snímku kompletně rekonstruovat předmětovou vlnu (její amplitudu a fázi) [27]. Díky tomu jsou holografické mikroskopy vhodné pro pozorování rychle se měnících dějů, jako jsou například živé buňky.

Nevýhodou mimoosové interference běžných holografických mikroskopů je, že kvůli nenulovému úhlu mezi předmětovou a referenční větví není interferometr achromatický a v některých případech není ani prostorově invariantní. Aby v těchto zařízeních nastala interference v celém obrazovém poli, je nutné použít koherentní osvětlení, případně osvětlení s omezenou prostorovou koherencí. Při koherentním osvětlení je však příčné rozlišení horší než při nekoherentním osvětlení. Navíc použití koherentního světla vede ke koherenčnímu zašumění obrazu (speckle) a ke vzniku nežádoucích interferencí a difrakcí od objímek čoček nebo případných nečistot na jejich površích. Kvůli těmto negativním jevům a nižšímu rozlišení je kvalita výsledného zobrazení výrazně nižší než při použití nekoherentního osvětlení [27].

CCHM nepoužívá k tvorbě hologramu klasického interferometru, ale achromatického prostorově invariantního interferometru, který využívá principu zobrazení difrakční mřížky [28]. Díky tomu je možné v CCHM používat osvětlení s libovolnou koherencí. Používá-li se vysoce koherentní osvětlení je možné realizovat numerické přestřování [27]. Použití světla s nízkou koherencí zlepšuje kvalitu zobrazení a umožňuje provádět optické řezy a pozorovat vzorek v rozptylujícím prostředí [27]. Optická sestava transmisního CCHM je zobrazena na obrázku 3.1.



Obrázek 3.1: Optické schéma CCHM: Zd - zdroj světla, AC - aperturní clona, IF - interferenční filtr, Kol - kolektor, D - dělič svazků, Z - zrcadla, K - kondenzory, Sp - vzorek, RO - referenční objekt, O - objektivy, TČ - tubusové čočky, MO - roviny meziobrazů, DM - difrakční mřížka, VO - výstupní objektivy, VR - výstupní rovina, K - CCD kamera. Převzato a upraveno z [24].

Jako zdroj světla slouží v tomto mikroskopu halogenová lampa, což je plošný polychromatický zdroj. Světlo z lampy je vyvedeno do roviny zdroje Zd a děličem svazku D_1 je rozděleno do referenční a objektové větve. Vzorek Sp a referenční objekt RO jsou osvětleny pomocí Köhlerova principu. To znamená, že každý bod zdroje je zobrazován skrze kolektorovou čočku Kol do zadních ohniskových rovin kondenzorů $K_{1,2}$ a za kondenzory se proto šíří sestava rovinných vln. Vzorek a referenční objekt jsou pomocí objektivů $O_{1,2}$ a tubusových čoček TČ_{1,2} zobrazeny do roviny, kde vznikají jejich meziobrazy $MO_{1,2}$. Do roviny meziobrazů $MO_{1,2}$ je v objektové větvi vloženo zrcadlo Z_2 a v referenční větvi difrakční mřížka DM. Roviny meziobrazů $MO_{1,2}$ jsou výstupními objektivy $VO_{1,2}$ zobrazeny na CCD kameru K, kde dochází k interferenci mezi objektovou vlnou a vlnou prvního difrakčního řádu mřížky. Vzniklý interferenční obrazec má stejnou prostorovou frekvenci pro všechny vlnové délky světla ve všech místech výstupní roviny VR [29]. Z interferenčního obrazce se pomocí numerických metod [30] získá pro každý obrazový bod kvantitativní informace o amplitudě a fázi objektové vlny. Takové zobrazení nazýváme jako kvantitativní fázové zobrazování (QPI). Fázové informace z QPI je možné přepočítat na plošnou hustotu suché hmoty v buňce [31]. Na změnách rozložení suché hmoty je možné pozorovat buněčné děje, například růst, dělení nebo pohyb. S využitím CCHM lze tudíž sledovat reakce živých buněk na definovanou zátěž v podobě biologických činidel [32].

3.2. Pozorovací komory pro CCHM

Při mikroskopování jsou buňky umístěny v pozorovacích komorách (misky, kanálky, podložní sklíčka apod.). Tyto komory musí splňovat určité optické požadavky, které plynou z principu funkce CCHM. Při zobrazování CCHM dochází k interferenci mezi svazky z referenční a objektové větve a aby nedocházelo k poklesu holografického signálu, je nutné, aby paprsky v obou větvích urazili stejnou optickou dráhu [29]. Referenční objekt má optickou dráhu přesně definovanou, jelikož se jako referenční objekt používá bloček skla s přesně definovanou tloušťkou po celé ploše. Pozorovaný vzorek (tzn. v našem případě kultivační komora s buňkami) by také měl mít konstantní optickou dráhu po celé ploše. Proto je nutné, aby pozorovací komora měla rovnoběžné horní i spodní sklíčko a aby sklíčka měly konstantní tloušťku. Na optickou dráhu může mít vliv také materiál komůrky. Optické části pozorovací komůrky, skrz které prochází světlo, by proto měly být vyrobeny ze skla. Plasty nejsou opticky izotropní a mohly by do optické cesty pro různé směry polarizace světla vnášet různé fázové zpoždění.

Buňky se většinou kultivují a pozorují v komorách s kapalným médiem. Volná hladina média se může v důsledku vnějších vibrací vlnit a navíc v místě rozhraní kapaliny a stěny se na volné hladině tvoří meniskus. Tyto nerovnosti hladiny způsobují, že paprsky prošlé skrz médium nejsou zcela rovnoběžné, což má negativní vliv na zobrazování. Aby se nerovnostem hladiny zabránilo, musí být při mikroskopování na CCHM hladina média nějakým způsobem zakrytá.

Všechny tyto požadavky splňují pouze některé komerčně dostupné komory a proto jsou v Laboratoři experimentální biofotoniky vyvíjeny a vyráběny také vlastní komory, které jsou přizpůsobené použití na CCHM. Již dlouho a úspěšně se používají vlastní stacionární i průtokové komory [32, 33].

3.3. Příslušenství CCHM a zhodnocení vhodnosti komerčně dostupných zařízení

Kvůli zajištění fyziologické teploty buněk během pozorování je mikroskop vybaven vyhřívanou inkubační komorou z plexiskla, která zajišťuje správnou teplotu vzorku [33]. Vyhřívání komory je realizováno rezistory v topných deskách, které jsou umístěny kolem mikroskopu. Komora je vyhřívána na 37°C a teplota je měřena na mikroskopovém stolku a na těle mikroskopu. Vyhřívání je důležité nejen pro vitalitu buněk, ale také pro stabilní zaostření mikroskopu [33]. Při kolísání teploty totiž dochází k tepelným dilatacím kovových částí mikroskopu a to vede ke změnám délky optických drah. Proto je nutné všechny části mikroskopu temperovat, zejména objektivy.

Při experimentech s proudícím médiem se výměna média většinou realizuje gravitačním spádem. Jak již bylo zmíněno v části 1.1, proudění gravitačním spádem je obtížně regulovatelná a vytvořený proud není laminární. Proto by bylo vhodné vybavit CCHM pokročilejším perfuzním systémem. Vzhledem ke snaze o spojení příslušenství do jednoho systému, by bylo přínosné, aby nový systém řídil i výměnu atmosféry. V atmosféře je

potřeba udržovat dostatečnou vlhkost a správnou koncentraci oxidu uhličitého. Jak bylo zmíněno v části 1.3, správná koncentrace CO₂ by měla být 3%. Současný vyhřívací systém není potřeba měnit, neboť inkubační komora plně vyhovuje potřebám techniky QPI. Inkubační komora, však dává omezení prostoru pro nové obslužné příslušenství. Malý prostor, eliminuje použití některých komerčních systémů, popsaných v části 2. Například systémy Aria (Fluigent) a CubiX (Cherry Biotech) jsou příliš velké a musely by být umístěny mimo komoru. Aria nemá žádné vlastní vyhřívání, takže by médium ze zásobních lahvítek teklo do pozorovací komory nezahřáté na požadovanou teplotu.

Systémy firmy Bioptechs, Delta T System (bez perfuze média) a FCS (s perfuzí média), se zaměřují především na přesné vyhřívání pozorovacích komor. I když FCS umožňuje výměnu média, nejsou pumpy pro čerpání média a atmosféry součástí systému. Pumpy tudíž nejsou ani zahrnuty v ceně systému, která je již kvůli kontroloru teploty a precizním vyhříváním komůrkám poměrně vysoká.

Systémy Perfusion Pack (Cherry Biotech) a Organ-On-Chip (Fluigent) si jsou dost podobné, jelikož oba dva systémy používají k dávkování přetlak v tlakových zkumavkách a obsahují vícechodý ventil a senzor průtoku. Perfusion Pack však zajišťuje pouze dávkování média a ne proudění atmosféry. Organ-On-Chip umožňuje i dávkování plynů, ale jeho nevýhodou je, že u něj není zaručeno, jestli je kompatibilní i s jinými pozorovacími komorami než s Micronit čipem.

Použití systémů Ibidi Pump System a Ibidi Gas Incubation System dohromady by zajišťovalo výměnu atmosféry i média. Oba Ibidi systémy jsou také kompatibilní s libovolnými průtokovými komůrkami s Luer konektory. Nevýhodou těchto systémů je, že Ibidi Gas Incubation System pouze dodává namíchanou atmosféru do komůrky, ale už ji neodčerpává zpět. Není tedy možné atmosféru cirkulovat, ale atmosféra se musí stále nově dodávat.

Obecně tedy lze říci, že komerční systémy zlepšují přesnost řízení kultivačních podmínek a také umožňují udržovat stabilní podmínky i po dlouhou dobu. Toho je dosaženo zavedením senzorů se zpětnou vazbou a automatizovaných procedur, které nahrazují manuální úkony, jako je např. pipetování. Díky tomu jsou automatizované komerční systémy méně náročné na obsluhu a uživatel se tak může více věnovat samotnému mikroskopování. Nicméně ze zhodnocení jednotlivých komerčních systémů je patrné, že většina z nich nevyhovuje zcela aktuálním potřebám Laboratoře experimentální biofotoniky. Proto jsem se rozhodla pro výrobu vlastní pozorovací komory s příslušenstvím, tzv. bioreaktoru, navrženému na míru potřebám laboratoře.

4. Cíle diplomové práce

Chování buněk je ovlivňováno kultivačními podmínkami prostředí, ve kterém se buňky nacházejí. Při některých biologických experimentech by buňky měly být pozorovány v přirozeném prostředí a tudíž je pro ně potřeba zajistit vhodné stabilní kultivační podmínky. Naopak při experimentech, kdy jsou sledovány reakce buněk na různé vlivy okolí, je třeba kultivační podmínky měnit. V obou případech je však nutné kultivační podmínky kontrolovat a řídit. Proto se jeví jako nezbytné při biologických experimentech používat automatizované kultivační zařízení (bioreaktor). Toto zařízení by mělo umožňovat kontrolu atmosféry s definovanou koncentrací oxidu uhličitého a také řízení výměny média a atmosféry. Bioreaktor musí také zajišťovat dostatečnou optickou kvalitu zobrazení technikou QPI, a proto bude vybaveno minimálně jednou pozorovací komorou. K realizaci bioreaktoru je potřeba dosáhnout těchto dílčích cílů:

- upravit stávající koncept bioreaktoru, případně navrhnout nové řešení,
- navrhnout obslužné příslušenství pro řízení změny kultivačních podmínek,
- navrhnout řídicí software,
- bioreaktor otestovat.

5. Návrh automatizovaného systému bioreaktoru

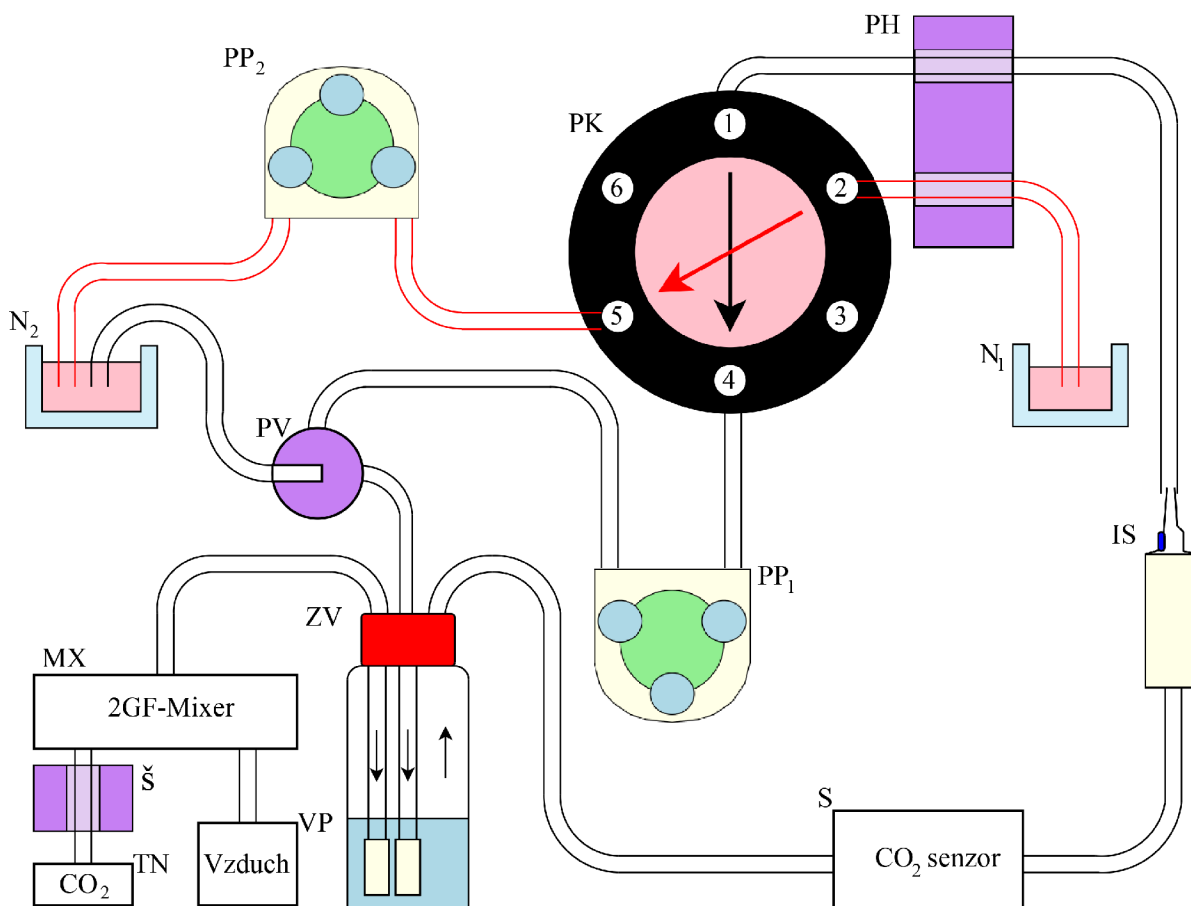
V této části jsem navrhla systém bioreaktoru, který je určen pro použití na holografickém mikroskopu CCHM v Laboratoři experimentální biofotoniky na Fakultě strojního inženýrství VUT v Brně. Účelem systému bioreaktoru je automatizovaně řídit kultivační podmínky, tak aby bylo co nejméně narušeno pozorování buněk. To například znamená, že se bioreaktor nemusí kvůli změně kultivačních podmínek sundávat z mikroskopového stolku nebo že se pozorovací komora nemusí otvírat apod. Centrální částí bioreaktoru jsou dvě uzavřené pozorovací komory. Na komory je napojeno obslužné příslušenství, které díky obslužnému softwaru zajišťuje tyto funkce:

- výměnu krmného média v komoře,
- přidávání činidel do komory,
- měření množství CO_2 v atmosféře a měření její relativní vlhkosti,
- cirkulaci a výměnu atmosféry,
- automatickou výměnu atmosféry v případě koncentrace CO_2 mimo povolené meze.

5.1. Popis a funkce bioreaktoru

Navržený systém bioreaktoru je uveden na obr. 5.1. Pozorované buňky jsou umístěny v krmném médiu uvnitř pozorovací komory PK. Pozorovací komora PK je z části naplněna médiem a z části vhodnou atmosférou. Komora PK je uzavřena takže nedochází k samovolné výměně atmosféry s okolím. Řízená výměna atmosféry a média se děje skrz porty P, do kterých jsou zavedené jehly s připojenými hadičkami. Porty P_2 a P_5 jsou použity pro vstup a výstup média a porty P_1 a P_4 pro vstup a výstup atmosféry. Celkem pozorovací komora obsahuje šest portů. Zbylé dva porty P_3 a P_6 jsou uzavřeny, ale v případě potřeby mohou být použity např. pro přidávání činidel nebo pro jiné potřeby experimentu. Systém bioreaktoru je vybaven dvěma pozorovacími komorami PK. K obslužnému příslušenství je však vždy připojena jen jedna komora a pro změnu komory je třeba příslušenství přepojit.

Systém příslušenství lze rozdělit na část zajišťující výměnu média a na část zajišťující vhodnou atmosféru. Pohyb média je zajištěn peristaltickou pumpou PP_2 umístěnou na výstupním portu P_5 . Pumpa čerpá médium z komory PK ven a podtlakem je nasáváno nové médium. Aby se nové médium nasávalo pouze z portu P_2 , jsou ostatní čtyři porty uzavřeny. Porty P_3 a P_6 jsou uzavřeny trvale. Port P_4 pro výstup atmosféry je uzavřen vypnutou peristaltickou pumpou, díky tomu že rotor čerpací hlavy hadičku mačká. Port P_1 pro vstup atmosféry je uzavřen pomocí přepínače hadiček PH, jehož konstrukce je popsána v části (6.2.3). Přepínač PH lze nastavit do polohy, kdy uzavírá hadičky se vstupujícím médiem do portu P_2 a nebo hadičku se vstupujícím vzduchem do portu P_1 . V čase kdy se nevyžaduje pohyb média, je pumpa PP_2 vypnuta a přepínač PH je nastaven



Obrázek 5.1: Schéma zapojení bioreaktoru. V části pro výměnu atmosféry jsou hadičky označeny černě, v části pro výměnu média červeně. Jednotlivé komponenty jsou: PK - pozorovací komora, PP₁ - peristaltická pumpa pro čerpání atmosféry, PP₂ - peristaltická pumpa pro čerpání média, PV - přepínací ventil, ZV - zvlhčovač vzduchu, N₁ zásobní nádrž s médiem, N₂ - odpadní nádrž, IS - infúzní set pro přidávání činidel, S - senzor Explor®IR-M, MX - 2GF mixér Okolab, Š - škrtidlo, TN - tlaková nádoba s CO₂, VP - vzduchová pumpa OKO-AP Okolab.

do polohy, kdy uzavírá hadici s médiem (tj. uzavírá port P₂). Pouze během doby, kdy se vyměňuje médium, přepne se přepínač PH tak, aby uzavíral hadičku vstupu atmosféry (tj. port P₁). Médium odčerpávané z pozorovací komory PK se sbírá do odpadní nádrže N₂ a po skončení experimentu se může analyzovat.

Druhá část obslužného systému slouží k zajištění proudění atmosféry. Tuto část systému lze přepínacím ventilem PV přepínat mezi otevřeným a uzavřeným módem proudění. V otevřeném módu se v mixéru MX namíchá vhodná atmosféra ze vzduchu z místnosti nasátého pumpou VP a z oxidu uhličitého z tlakové nádoby TN. Namíchaná atmosféra pak je vedena přes zvlhčovač vzduchu ZV do pozorovací komory PK a peristaltickou pumpou PP₁ je vyčerpávána přes ventil PV ven ze systému do odpadní nádrže N₂. Tento otevřený mód se používá, když v pozorovací komoře PK není atmosféra se správnou koncentrací CO₂ a je tedy nutné nevhodnou atmosféru odčerpat a přivést novou. Naopak v případě, že v pozorovací komoře PK je atmosféra s vhodným složením, není potřeba neustále vy-

tvářet a přivádět novou atmosféru. A proto se v tomto případě používá uzavřený mód. V uzavřeném módu je mixér atmosféry MX vypnutý a přepnutím ventilu PV se docílí toho, že atmosféra cirkuluje v uzavřeném okruhu. Pro zjištění aktuální koncentrace CO_2 je systém vybaven CO_2 senzorem S. Pokud senzor S detekuje, že hladina CO_2 je mimo stanovené meze, automaticky se systém přepne z uzavřeného módu do otevřeného, dokud se neobnoví správná hodnota koncentrace CO_2 (kolem 3%). Uživatel také může podle potřeby mezi módy přepínat prostřednictvím obslužného softwaru.

Kromě výměny atmosféry má tato část systému ještě další funkci a tou je prevence před příliš vysokou hladinou média v pozorovací komoře. Jehla v portu výstupu atmosféry P_4 je namontována tak, aby její konec byl ve výšce požadované hladiny. Pokud výška hladiny přesáhne tuto mez, je přebytečné médium odčerpáno peristaltickou pumpou PP_1 . Při provozu v otevřeném módu je nasáté médium vyvedeno do odpadní nádoby N_2 . Při provozu v uzavřeném módu se nasáté médium dostane do vody v zvlhčovači ZV. Po skončení experimentu se zvlhčovač ZV vždy vylévá a pro nový experiment se naplňuje čistou vodou.

Při mikroskopování živých buněk se často sleduje jejich reakce na různá činidla (např. růstové výživy, inhibitory, toxické látky, léčiva apod.) Činidlo může být do pozorovací komory dopraveno jako bolusová dávka (tzn. malé množství čistého činidla) nebo v roztoku média. Pro insert činidla formou bolusu je bioreaktor vybaven infúzním setem IS[34], který je zakomponován do okruhu pro cirkulaci atmosféry. Přidání činidla se tedy realizuje tak, že odměřené množství čistého činidla se vstříkne injekční stříkačkou do infuzního setu ISa odtud je činidlo spolu s atmosférou pumpou PP_1 nasáto do pozorovací komory PK.

6. Realizace automatizovaného bioreaktoru

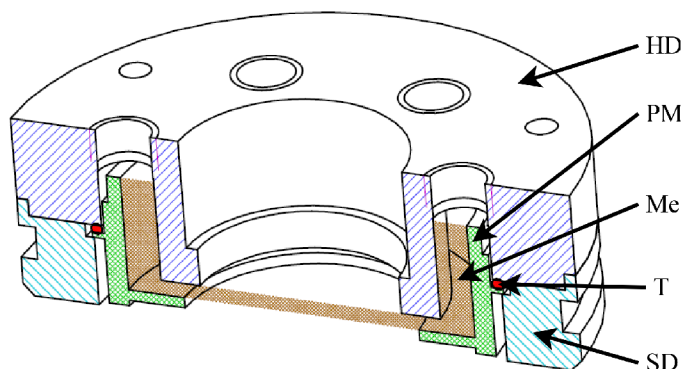
bioreaktoru

Automatizovaný systém bioreaktoru se skládá z pozorovací komory PK a obslužného příslušenství. Toto příslušenství se skládá z mechanických komponent (např. pumpy, servomotory, zvlhčovač) a elektronických komponent, které slouží například ke komunikaci mechanických částí a počítače. Nezbytnou součástí bioreaktoru je také obslužný software naprogramovaný v LabView. Jednotlivé části bioreaktoru jsou popsány v této části.

6.1. Pozorovací komora

Pozorovací komoru PK bioreaktoru navrhl doktor Pavel Veselý, který se zabývá aplikacemi CCHM v oblasti buněčné biologie. Při svých biologických experimentech tedy bude navržený bioreaktor často využívat. Jak již bylo zmíněno v části 5.1, bioreaktor je vybaven dvěma pozorovacími komorami PK, přičemž pro pozorování je vždy využívána jen jedna a pro změnu komory PK je nutné přepojit připojovací hadičky.

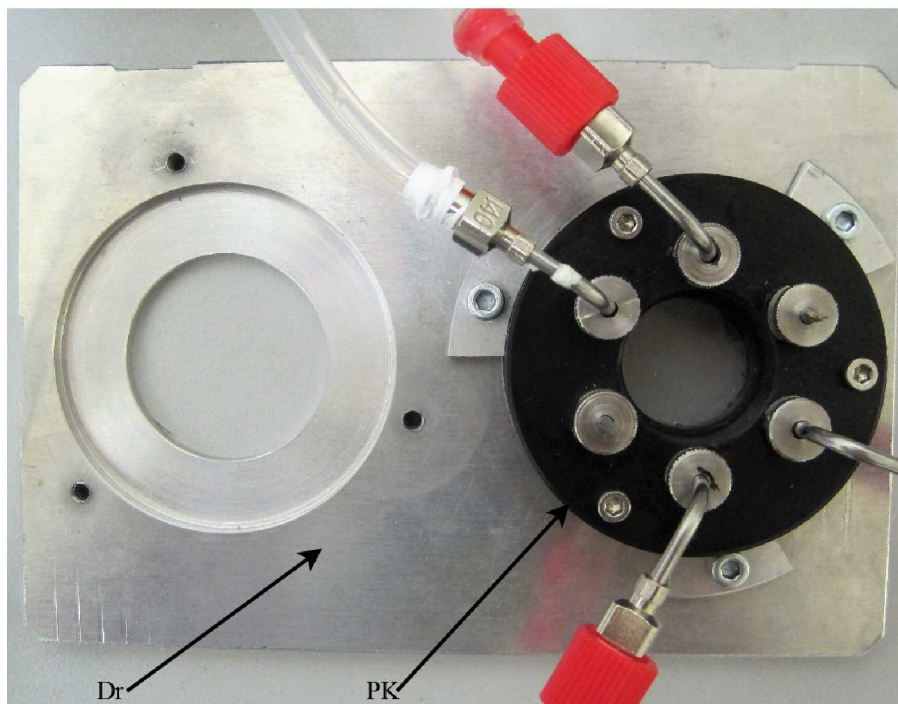
Konstrukce pozorovací komory PK je znázorněna na obrázku 6.1. Ústřední částí komory je skleněná Petriho miska PM o průměru 35 mm. Miska PM s médiem s buňkami Me je umístěna mezi spodním dílem SD a horním dílem HD, které jsou spojeny šrouby a spoj je utěsněn gumovým těsněním T. Díky tomu se předchází kontaminaci a nedochází k výměně atmosféry s okolím. Ve střední části horního dílu HD je přilepeno sklíčko a díl je snížen tak, že se sklíčko dotýká hladiny média. Díky tomu není v pozorované oblasti volná hladina média Me, která bývá nerovná.



Obrázek 6.1: Řez pozorovací komorou PK: HD - horní díl, P - port, PM - Petriho miska, Me - médium s pozorovanými buňkami, SD - spodní díl, T - těsnění.

Systém příslušenství se k pozorovací komoře připojuje pomocí šesti portů P v komoře PK (viz obr. 5.1). Porty P jsou opatřeny závity, takže do nich lze našroubovat průchodky pro hypodermické jehly s napojenými hadičkami. Kvůli utěsnění jsou závity průchodek omotány teflonovou páskou a jehly jsou opatřeny gumovým těsněním. Jehly byly ohnuty na ohýbačce a podle funkce seříznuty na různé délky. Jehla na vstupu média v portu P₂ byla seříznuta tak, aby byla ponořena v médiu Me, ale nedosahovala až na úplné dno.

Jehla na výstupu média v portu P_5 sahá až na dno komory PK, aby bylo možné pumpou PP_2 připojenou na tento port vyčerpat veškeré médium Me z komory PK. Jehla na vstupu atmosféry v portu P_1 je seříznuta tak, aby konec jehly byl úplně nahoře komory. A jehla na výstupu atmosféry v portu P_4 je umístěna tak, aby její konec byl přesně ve výšce požadované hladiny média. Díky tomu může pumpa PP_1 připojená k portu P_4 odčerpávat přebytečné médium nad požadovanou hladinou. Obě pozorovací komory PK se montují do společného hliníkového držáku Dr (viz obr. 6.2).



Obrázek 6.2: Pozorovací komora PK namontovaná v držáku Dr.

6.2. Mechanika

Několik komponent bioreaktoru (např. zvlhčovač ZV a mixér atmosféry MX) byly již dříve používány v Laboratoři experimentální biofotoniky. Většina součástí však musela být nově zakoupena nebo vyrobena. Zakoupených komponent bylo mnoho (servomotory, čerpací hlavy, hadičky, šroubení atd.) Nieméně aby bylo možné zapojit tyto komerční díly do bioreaktoru, bylo někdy nutné pro ně vyrobit stojany a spojky. Vyráběné díly byly buď vyrobeny z hliníku nebo z oceli na strojírenské dílně (např. spojky a stojany servomotorů) a nebo byly vytisknuty na 3D tiskárně a následně obrobena (např. přepínač hadiček PH, kryt CO_2 senzoru S nebo škrtdlo Š).

6.2.1. Peristaltické pumpy poháněné servomotory

Bioreaktor obsahuje dvě identické peristaltické pumpy PP, jednu pro čerpání atmosféry a druhou pro čerpání média. Základní dvě součásti použitých pump jsou čerpací hlava ČH, která zajišťuje pohyb tekutiny, a servomotor SM_1 , který slouží jako pohon. Byla použita

čerpací hlava Masterflex L/S® Standard Pump Head [35] (viz obr. 6.3), která obsahuje rotor s třemi kladkami. Rotor včetně kladek je vyroben ze zastudena tažené oceli. Kryt je vyroben z transparentního polykarbonátu, takže je možné vizuálně kontrolovat, jestli je hadička v pumpě správně umístěna.



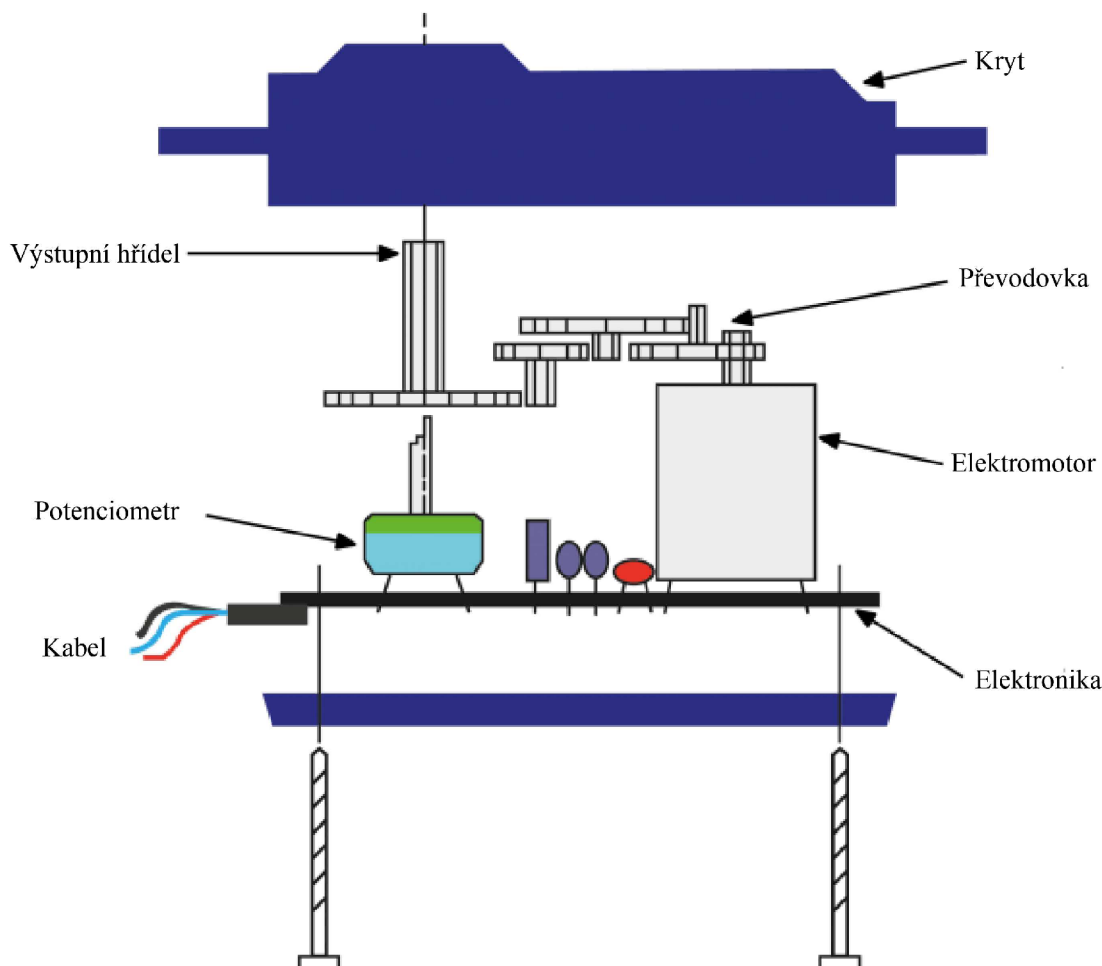
Obrázek 6.3: Čerpací hlava Masterflex L/S® Standard Pump Head. Převzato z [36].



Obrázek 6.4: Analogový servomotor HS-805 MG. Převzato z [37].

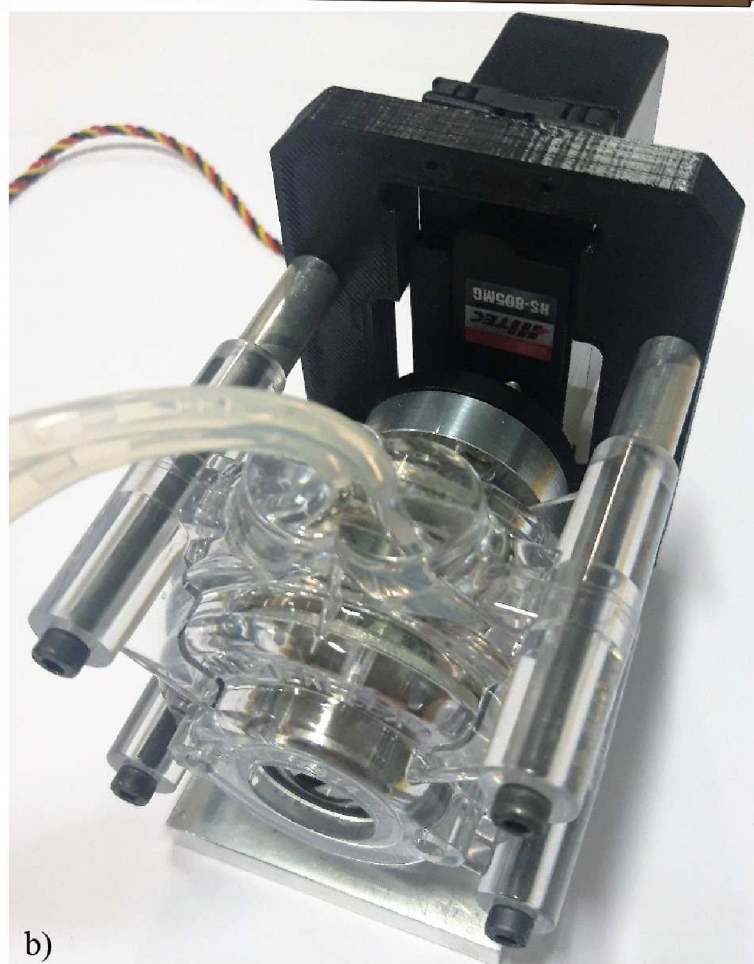
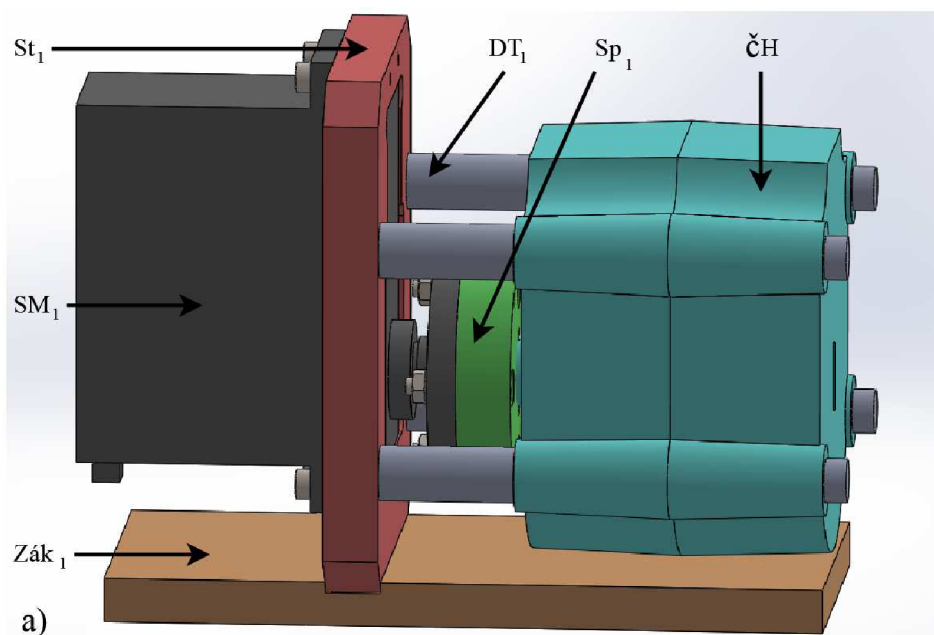
Čerpací hlavy ČH jsou poháněny analogovými servomotory SM₁ HS-805 MG (viz obr. 6.4) [37]. Servomotory jsou motory, u kterých lze na rozdíl od běžného motoru nastavit přesnou polohu natočení výstupního hřídele. Servomotor nepracuje samostatně, ale musí být pomocí konektoru připojen k nadřazenému řídicímu systému, ze kterého dostává řídicí povely a skrz který je připojen ke zdroji napětí. V systému bioreaktoru byl použit nadřazený řídicímu systém SOS-AT, který je popsán v části 6.3.2. Servomotor obsahuje stejnosměrný elektromotor, který přes vícestupňovou převodovku otáčí hřídel s pákou (viz obr. 6.5). Zpravidla poslední kolo převodovky je připojeno k zpětnovazebnímu poten-

ciometru a elektronice, která porovnává, zda signál z ovladače odpovídá natočení hřídele. Aby servomotory mohly sloužit jako pohony čerpacích hlav, bylo nutné ze servomotorů odstranit zpětnou vazbu, která kontroluje polohu hřídele, a také zarážky, které omezují rozsah pohybu. Díky těmto technickým úpravám po přijmutí řídicího impulsu koná výstupní hřídel rovnoměrný rotační pohyb a lze signály z karty SOS-AT řídit rychlost otáčení výstupního hřídele. Experimentálně bylo zjištěno, že při maximálních otáčkách servomotoru je průtok čerpadlem ($11,7 \pm 0,3$) ml/min.



Obrázek 6.5: Schéma konstrukce servomotoru. Převzato a upraveno z [38].

Vzhledem k tomu, že čerpací hlavy ČH a servomotory SM_1 pocházejí od různých výrobců, bylo nutné konstrukčně vyřešit spojení těchto prvků. To konkrétně obnášelo návrh a výrobu spojky Sp_1 , která přenáší kroutící moment ze servomotoru SM_1 na čerpací hlavu ČH, a dále stojanu St_1 a základnu $Zák_1$, které drží součásti ve správné vzájemné pozici. Hliníková spojka Sp_1 je na jedné straně přišroubována k páce servomotoru SM_1 a na druhé straně má drážku pro hřídel čerpací hlavy ČH. Aby se spojka Sp_1 nemohla uvolnit, tak je celá konstrukce spojena dohromady čtyřmi dlouhými šrouby (viz obr. 6.6).

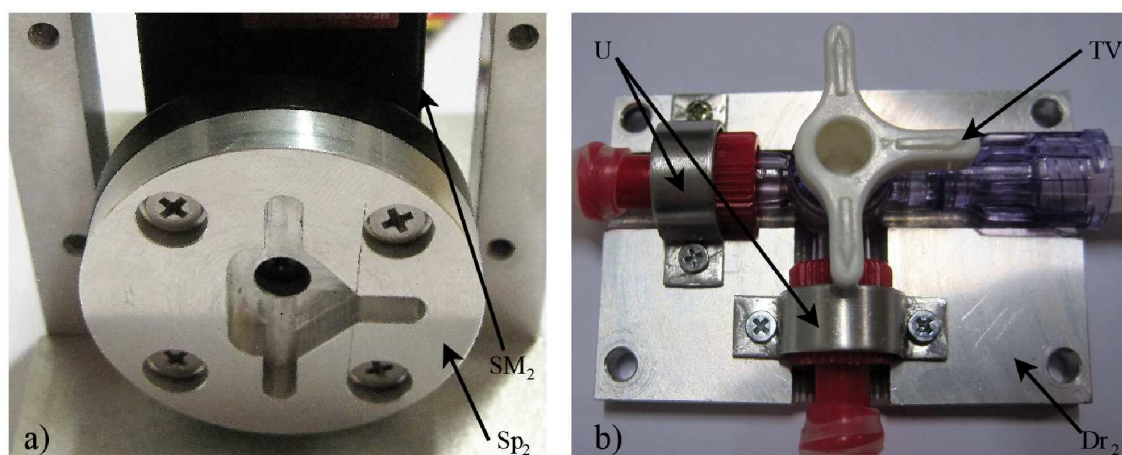


Obrázek 6.6: Sestava peristaltické pumpy PP. a) Návrh: ČH - peristaltická čerpací hlava, SM₁ - servomotor , Sp₁ - spojka, St₁ - stojan, Zák₁ - základna, DT₁ - distanční trubka. b) Realizace.

6.2.2. Přepínací ventil

Přepínací ventil PV realizuje přepínání mezi uzavřeným a otevřeným módem proudění atmosféry. Jedná se o trojcestný ventil TV z polykarbonátu a polyethylenu [34]. Všechny tři vyústění ventilu TV jsou opatřeny Luer konektory. Aby bylo možné ventil TV ovládat prostřednictvím Lobslužného softwaru, byl ventil TV připojen k servomotoru SM₂ HS-805 MG. Servomotor SM₂ však nebylo nutné nijak mechanicky upravovat, protože narozdíl od pohonu čerpacích hlav ČH zde není potřeba kontinuální rotace. Bylo však potřeba vyjmout konfigurační spojku R v řídicí kartě SOS-AT. Vyjmutí této spojky zvyšuje rozsah pohybu servomotoru z $\pm 45^\circ$ na potřebný rozsah $\pm 90^\circ$ [39].

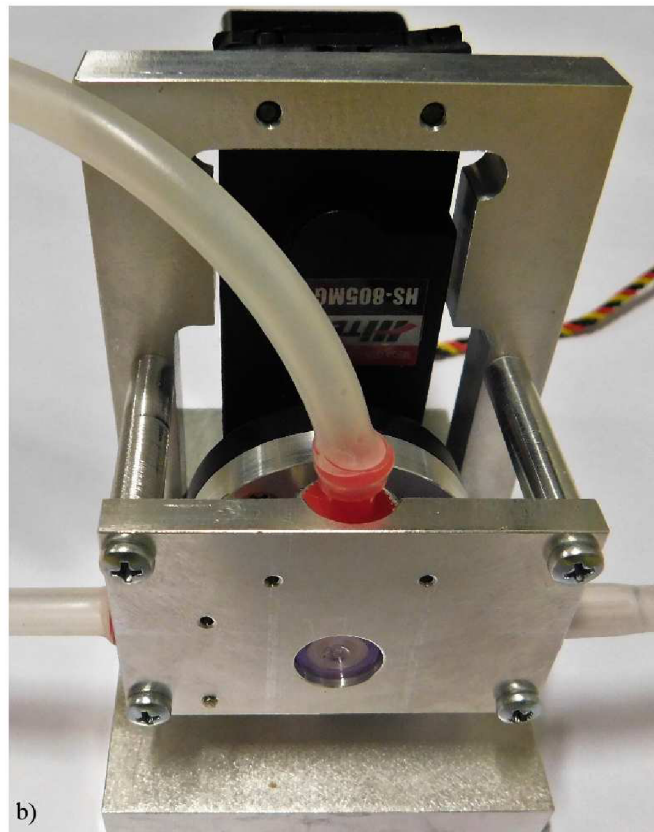
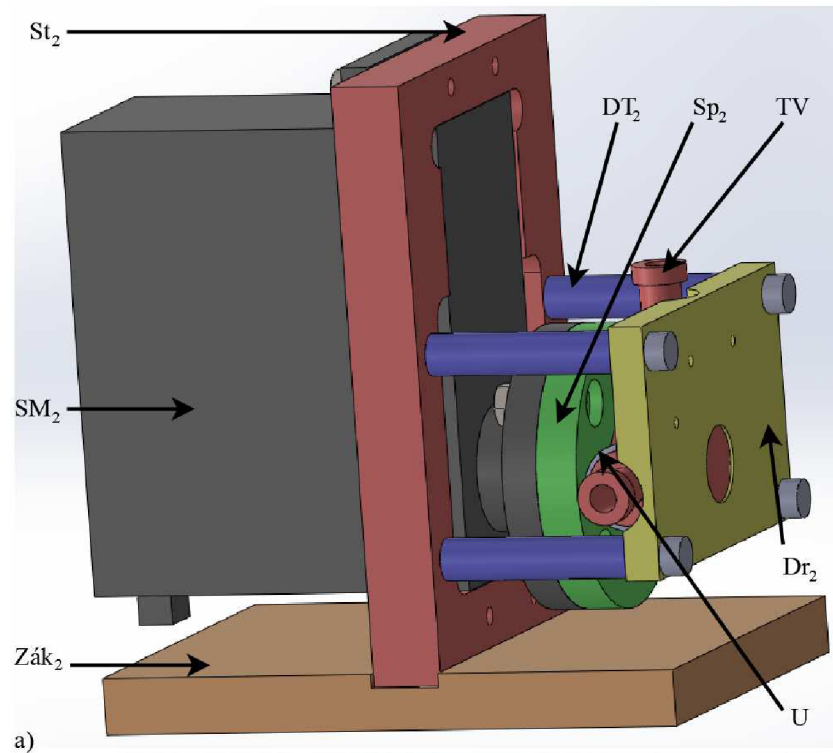
Spojení ventilu TV a servomotoru SM₂ bylo obdobné jako v konstrukci peristaltické pumpy PP (tzn. pomocí spojky Sp₂, stojanu St₂ a základny Zák₂). Spojka Sp₂ je na jedné straně opět přišroubována k páce servomotoru SM₂ a na druhé straně má spojka Sp drážku pro páku ventilu TV. Drážka však musela být složitěji tvarovaná než drážka ve spojce Sp₁ pro pumpu (viz obr. 6.7 a)). Vzhledem k tomu, že přepínací ventil TV nedisponuje žádnými chytami, kterými by bylo možné jej přímo připevnit k sestavě, bylo nutné pro něj vyrobit speciální držák Dr₂ s úchytkami U (viz obr. 6.7 b)). Držák Dr₂ je pomocí čtyř šroubů připevněn ke zbytku sestavy (viz obr. 6.8).



Obrázek 6.7: Detaily konstrukce přepínacího ventilu PV. a) Detail spojky Sp₂ mezi servomotorem SM₂ a trojcestným ventilem TV. Tvar drážky ve spojce Sp₂ je přizpůsoben tvaru páky ventilu TV. b) Trojcestný ventil TV je připevněn v držáku Dr₂ pomocí dvou úchytek U.

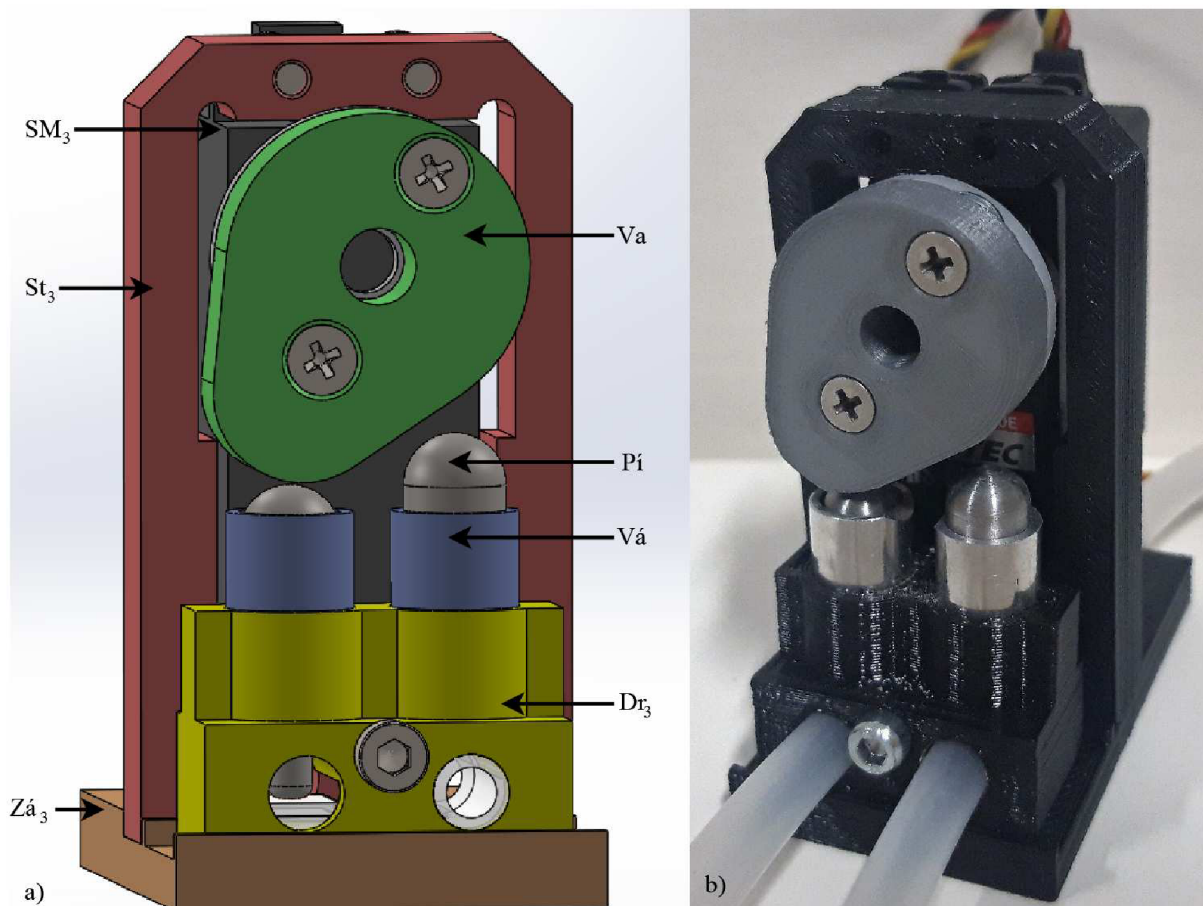
6.2.3. Přepínač hadiček

V části 5.1 byly popsány funkce bioreaktoru a mimo jiné zde byl zmíněn i přepínač hadiček PH, který podle potřeby uzavírá buď hadičku s atmosférou vstupující do portu P₁ a nebo hadičku s médiem vstupující do portu P₂. Díky tomu je zabráněno nasávání média místo atmosféry a obráceně. Přepínač je poháněn servomotorem HS-625 MG SM₃. K páce servomotoru SM₃ je přišroubována vačka Va, která podle natočení osy servomotoru SM₃ přes píst Pí stlačuje jednu nebo druhou hadičku (viz obr. 6.9). I když jsou písty



Obrázek 6.8: Sestava přepínacího ventilu PV. a) Návrh: TV - trojcestný ventil, Dr_2 - držák trojcestného ventilu, SM_2 - servomotor, St_2 - stojan, Sp_2 - spojka, $Zák_2$ - základna, DT - distanční trubky. b) Realizace.

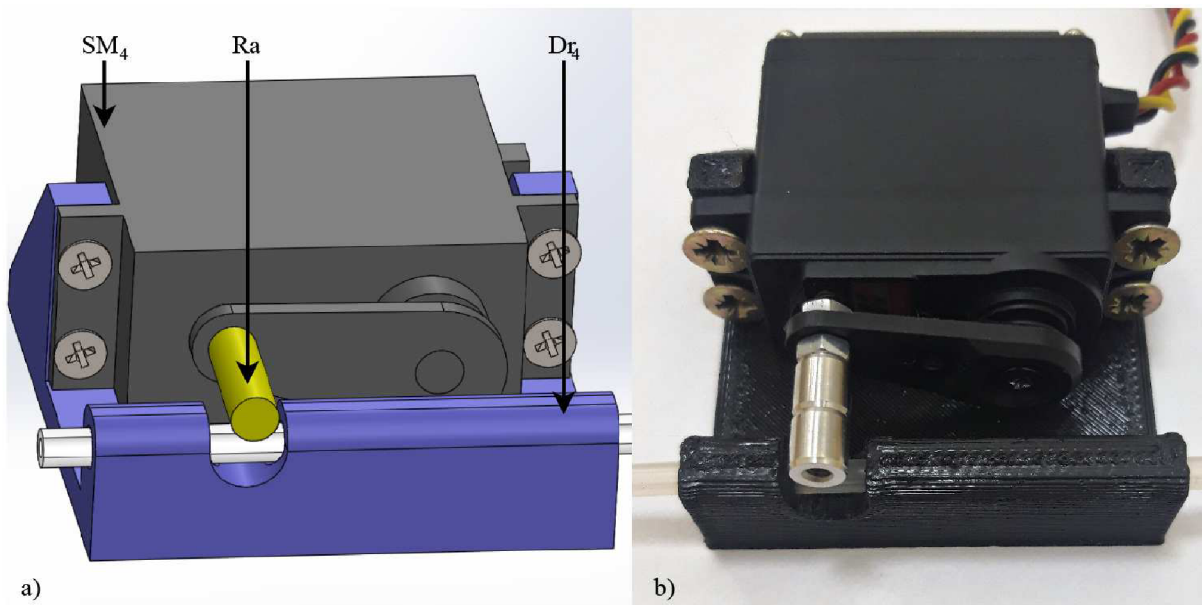
Pí vyrobeny z oceli, jsou dostatečně lehké na to, aby pro vrácení pístů Pízpět do horní polohy stačila tuhost hadiček.



Obrázek 6.9: Sestava přepínače hadiček PH. a) Návrh: Va - vačka, SM₃ - servomotor, Pí - písty, Vá - válce pro písty, Dr₃ - držák hadiček a pístů, St₃ - stojan, Zá₃ - základna. b) Realizace.

6.2.4. Škrtidlo

Podobnou funkci jako přepínač hadiček PV má škrtidlo Š. Slouží k uzavírání hadičky s oxidem uhličitým mezi tlakovou nádobou TN a mixérem MX (viz obr. 5.1). Mixér MX nelze vypínat a zapínat, a proto je nutné vypínat a zapínat přívod obou mixovaných plynů. Vzduch ze vzduchové pumpy VP se spíná pomocí relé, které je popsáno v části 6.3.3. Přívod oxidu uhličitého je vypínán a zapínán pomocí škrtidla Š. Aby mixérem namíchána atmosféra měla správnou koncentraci, musí relé a škrtidlo Š pracovat synchronizovaně. To je zajištěno obslužným softwarem. Škrtidlo Š je poháněno servomotorem HS-5645MG SM₄, k jehož páce je přišroubováno rameno Ra, které mačká hadičku k držáku Dr₄ (viz obr. 6.10).



Obrázek 6.10: Sestava škrtdla. a) Návrh: SM_4 - servomotor, Ra - rameno škrtdla, Dr_4 - držák. b) Realizace.

6.2.5. Zvlhčovač atmosféry

V bioreaktoru je použit probublávací zvlhčovač vzduchu ZV. Jak již bylo zmíněno v části 1.3, v probublávacích zvlhčovačích je plyn hadičkou přiveden do určité hloubky pod hladinu vody a zde se skrz porézní materiál uvolní do vody. Do bublin vzduchu stoupajících k hladině se vypařuje vodní pára a tím se zvyšuje vlhkost atmosféry. Zvlhčovač ZV v systému bioreaktoru obsahuje dva vstupy atmosféry a jeden výstup (viz obr. 6.11). Jeden vstup je pro nově namíchanou atmosféru z mixéru MX a druhý vstup je pro cirkulující atmosféru přicházející z pozorovací komory PK. Každý vstup má vlastní hadičku s porézním materiálem na jejím konci. Tímto porézním materiálem je provzdušňovací kámen, který je původně určen pro akvaristiku a je tedy snadno dostupný.

Výsledná vlhkost atmosféry je mimo jiné závislá na hloubce, do které je plyn přiváděn. Čím je plyn přiváděn hlouběji, tím je výsledná vlhkost atmosféry vyšší, protože bublinám plynu trvá déle než vystoupají na hladinu a může se tedy do nich uvolnit více vodních par. Větší hloubka vyústění plynu však také znamená větší odpor, který musí čerpadlo PP_1 překonat, protože ve větší hloubce je větší hydrostatický tlak. Aby tedy bioreaktor nebyl zbytečně natlakován, volíme co nejmenší hloubku ponoření porézního materiálu, ve které je výsledná vlhkost atmosféry ještě dostatečně vysoká.

6.2.6. Hadičky

Jednotlivé mechanické části bioreaktoru jsou propojeny hadičkami. V systému jsou použity především dva druhy hadiček. První typ jsou hadičky do peristaltických pump PP. Jedná se o silikonové hadičky vytvrzené platinou s vnitřním průměrem 1,6 mm [35]. Mimo peristaltické pumpy PP jsou použity měkčí silikonové hadičky s vnitřním průměrem 4 mm [40]. Pro spojení hadiček není potřeba používat redukce, protože velikost hadiček je právě



Obrázek 6.11: Probublávací zvlhčovač vzduchu ZV. Do zvlhčovače vedou dva vstupy a jeden výstup vzduchu. Ke vstupům jsou připojeny hadičky s porézními probublávači.

taková, že hadičky z peristaltických pump lze zasunout dovnitř větších hadiček a tak je dosaženo těsného spoje. Pro připojení hadiček k dalším dílům jsou použity buď šroubení, jako je tomu u připojení k zvlhčovači ZV nebo krytu CO₂ senzoru S. A nebo jsou použity Luer konektory, jako je tomu u připojení k pozorovací komoře PK a k přepínacímu ventilu PV.

6.3. Elektronika

Elektronické prvky v bioreaktoru se podílejí na automatizaci procesů při řízení kulturačních podmínek. V bioreaktoru jsou tři důležité elektronické prvky. První z nich je senzor ExplorIR®-M S, který měří množství oxidu uhličitého v atmosféře, relativní vlhkost, barometrický tlak a teplotu. Řídící karta SOS-AT slouží ke komunikaci servomotorů s počítačem a zajišťuje také jejich napájení. A třetí prvek je relé, které spíná napájení vzduchové pumpy VP. Relé je řízeno přes kartu National Instrument (NI karta).

6.3.1. Senzor ExplorIR®-M

Senzor ExplorIR®-M S měří koncentraci oxidu uhličitého v atmosféře v rozsahu od 0% do 5% [41]. ExplorIR®-M obsahuje nedispersní infračervený CO₂ senzor (zkráceně NDIR

z anglického názvu Nondispersive Infrared)(viz obr. 6.12). Označení nedisperzní znamená, že senzor neobsahuje žádné disperzní prvky (např. mřížka nebo hranol). NDIR senzory využívají toho, že plyny absorbují světlo o charakteristických vlnových délkách. Konkrétně oxid uhličitý absorbuje světlo o vlnové délce kolem $4,2 \mu\text{m}$ [42]. V senzoru ExplorIR je jako zdroj infračerveného světla použita LED dioda. Světlo z diody je nasměřováno na detektor. Před detektorem je umístěn filtr, který slouží k vyfiltrování světla se správnou vlnovou délkou. Detektor měří intenzitu infračerveného světla, ze které vypočítá hladinu CO_2 v atmosféře podle Lambert-Beerova zákona:

$$A = \epsilon c l, \quad (6.1)$$

kde A je absorbance, ϵ je molární absorpční koeficient pro danou vlnovou délku, c je molární koncentrace roztoku (v tomto případě koncentrace oxidu uhličitého) a l je vzdálenost mezi zdrojem a detektorem světla.



Obrázek 6.12: Senzor oxidu uhličitého ExplorIR®-M S.

Měření s NDIR senzory není závislé na vlhkosti a má jen nízkou teplotní závislost. Proces absorpce světla je však závislý na změnách atmosferického tlaku [43]. Se zvýšením tlaku se zvýší i vypočítaná koncentrace CO_2 a obráceně. Při normálním používání se vypočítaná hodnota CO_2 mění o 0,1% na 1 mbar. Senzor je standardně nakalibrován pro použití při tlaku 1013 mbar. Senzor však lze nakonfigurovat pro jiný barometrický tlak tím, že se při instalaci nastaví správná nadmořská výška [43]. Aby bylo možné sledovat aktuální tlak, je ExplorIR®-M vybaven senzorem barometrického tlaku, který měří v rozsahu 500–1150 mbar. A dále ExplorIR®-M obsahuje také senzory relativní vlhkosti a teploty.

Obousměrná komunikace mezi ExplorIR®-M senzorem S a počítačem se děje přes sériovou linku. 10-ti pinový konektor na senzoru se kabelem s USB/UART převodníkem připojuje k USB portu v počítači. Senzor S je z USB portu také napájen.

Pro práci s ExplorIR®-M senzorem S jsou k dispozici tři provozní režimy. V bioreaktoru je používán defaultní režim K1 (Streaming Mode), při kterém dvakrát za sekundu je prováděno měření a data jsou odesílána do PC. V režimu K2 (Polling Mode) je měření stále prováděno dvakrát za sekundu, ale data jsou odeslána až při zadání příkazu, což vede ke snížení spotřeby energie. Ve třetím módu K0 (Command Mode) nejsou prováděna žádná měření ani nejsou odesílána data, pokud nehní zadán požadavek. Tento mód je primárně určen pro interakci se senzorem (např. zjišťování sériového čísla a nebo hodnot digitální filtrace) [43].

Příkazy pro senzor S mají formát textového řetězce, který se skládá z jednoho písmene, mezery (volitelně) a jednoho nebo dvou numerických polí oddělených od sebe mezerou. Za každým příkazem musí být ještě napsán ukončovací kód <CR><LF>¹. Pokud je příkaz validní a správně naformátovaný, senzor S příkaz provede. Pokud je příkaz špatný, odpoví senzor chybovým hlášením. Chybové hlášení začíná písmenem „E“ následované mezerou a 5-ti ciferným číslem specifikujícím chybu. Další odpovědi senzoru mají obdobný tvar jako chybové hlášení, pouze na začátku kódu je jiné písmeno. Seznam nejdůležitějších odpovědí senzoru je v tabulce 6.1.

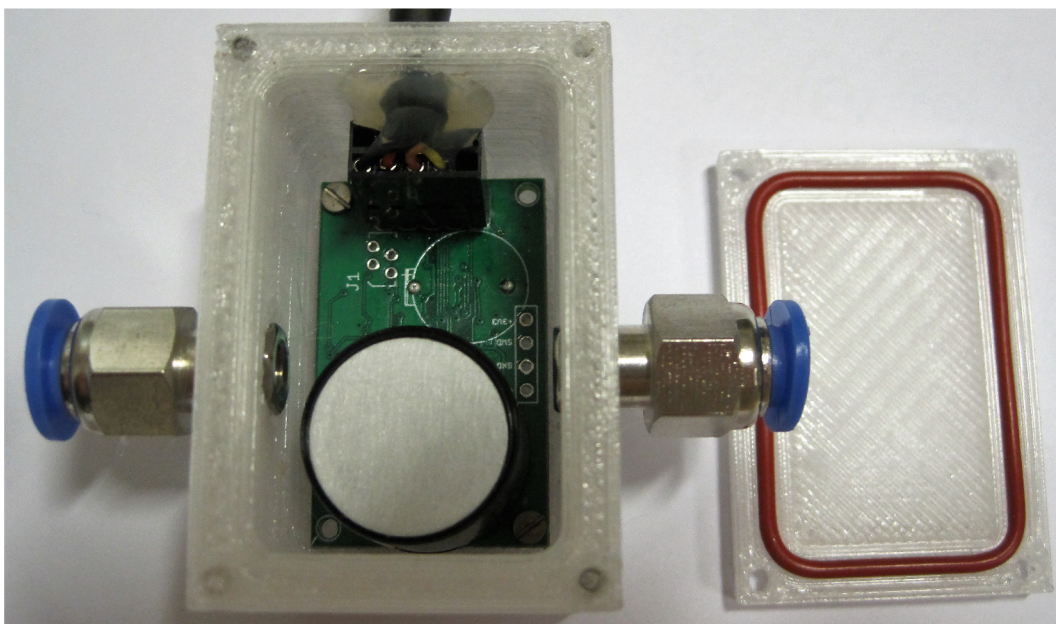
Tabulka 6.1: Přehled základních odpovědních kódů z ExplorIR®-M senzoru S a jejich interpretace. „xxxxx“ značí 5-ti ciferné číslo. Převzato z [43].

KÓD	VÝZNAM	PŘEPOČET	JEDNOTKA
Z xxxxx	CO ₂ koncentrace po digitální filtraci	×10	ppm
z xxxxx	CO ₂ koncentrace bez digitální filtrace	×10	ppm
T xxxxx	teplota	−1000 a pak ÷10	°C
H xxxxx	relativní vlhkost	÷10	%
B xxxxx	barometrický tlak	÷10	mbar

V tabulce 6.1 je zmíněna CO₂ koncentrace s a bez digitální filtrace. Digitální filtr funguje jako dolní propust (low-pass filter). To znamená, že nepropouští signály o frekvencích vyšších než je zadaná hodnota filtru. Digitální filtrace tedy snižuje šum, ale zároveň zpomaluje odezvu senzoru. Při nižších hodnotách filtru budou odezvy senzoru rychlejší. A při vyšších hodnotách bude lépe odstraněn šum, čímž se zlepší i rozlišení senzoru. Vyšší hodnota filtru se doporučuje při hledání přesné průměrné hodnoty. Filtr může být nastaven na hodnotu 1 až 65535. Nicméně pro normální použití se nedoporučuje nastavovat hodnotu vyšší než 64 [43]. Defaultně je nastavena hodnota 32, která je použita i v bioreaktoru.

Senzor ExplorIR®-M S byl připojen do systému bioreaktoru mezi zvlhčovač ZV a pozorovací komoru PK (viz obr. 5.1). Aby mohl být senzor S připojen, byl pro něj navržen kryt, který byl vytištěn na 3D tiskárně z kopolyesteru (CPE) (viz obr. 6.13). Senzor S je do krytu přišroubován malými šrouby a ven z krytu vede jen připojovací kabel. Víko je ke krytu přišroubováno šrouby a aby bylo zabráněno netěsnostem, je ve víku drážka pro silikonový o-kroužek. Na obou bocích krytu jsou díry pro připojení přímého šroubení s hadičkami. Šroubení jsou ke stěně krytu upevněny nerezovými maticemi.

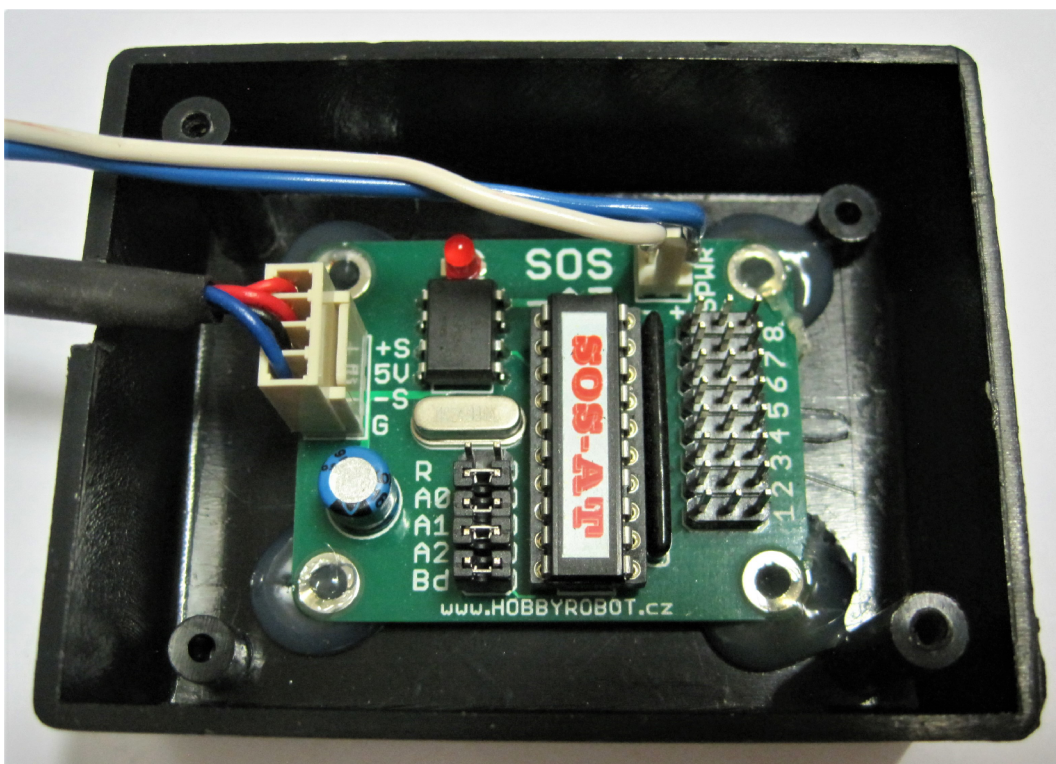
¹<CR> (carriage return, česky „návrat vozíku“) posune kurzor na začátek řádku a <LF> (line feed, česky „posun o řádek“) posune kurzor na další řádek.



Obrázek 6.13: Senzor ExplorIR®-M přišroubovaný do plastového krytu. Na vnitřní straně víka je drážka se silikonovým o-kroužkem.

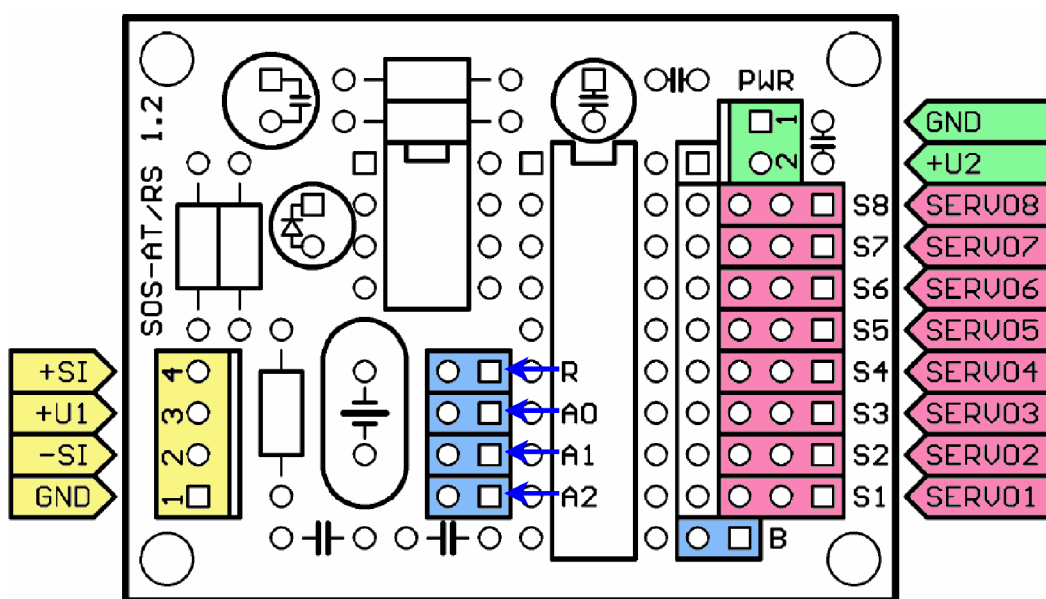
6.3.2. Řídící karta SOS-AT

Pro ovládání všech čtyř servomotorů SM v systému bioreaktoru je používána řídící karta SOS-AT (Sériový ovladač servomechanismů s mikroprocesorem Atmel) (viz obr. 6.14). Ovládání je možné přes sériovou komunikační linku dle standardů RS232, RS422 nebo RS485 [39].



Obrázek 6.14: Řídící karta SOS-AT.

Kartu SOS-AT je možno nakonfigurovat pro různé druhy provozu pomocí zasunutí nebo vysunutí zkratovacích spojek R, A0, A1, A2 a B (viz obr. 6.15). Spojky A0, A1 a A2 slouží k adresování řídicí karty. Kombinací sejmutí a vysunutí těchto tří spojek vznikne $2^3 = 8$ adres. Díky adresování je tedy možné na jednu komunikační linku připojit až 8 karet. Každá karta SOS-AT může řídit až 8 servomotorů. Naráz tedy lze nezávisle ovládat celkem až 64 servomotorů. Zkratovací spojka B nastavuje komunikační rychlost sériové linky. Se zasunutou spojkou B je komunikační rychlost 9600 Bd a se sejmoutou spojkou je 2400 Bd. Zkratovací spojka R určuje rozsah pohybu serv. Se zasunutou spojkou R je rozsah servomotorů $\pm 45^\circ$ a nejmenší dosažitelný krok výstupního hřídele je $0,36^\circ$. Po vysunutí spojky R se rozsah zvětší na $\pm 90^\circ$, ale zvětší se i nejmenší dosažitelný krok výstupního hřídele serva na $0,72^\circ$, tj. na dvojnásobek kroku původního. Jak již bylo zmíněno v části 6.2.2, pro otáčení přepínacího ventilu je potřeba rozsah pohybu $\pm 90^\circ$, a proto byla spojka R z karty vyjmuta.



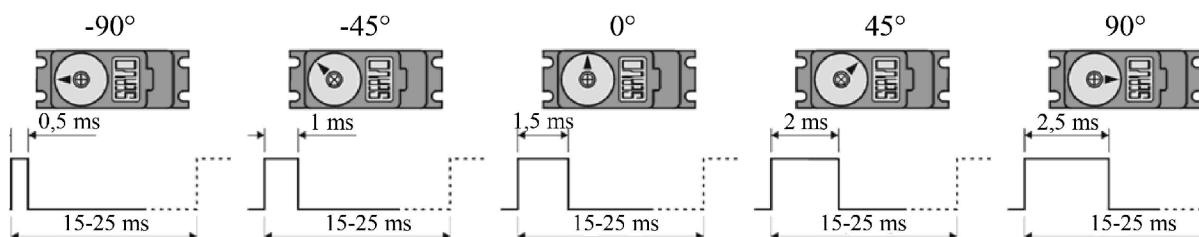
Obrázek 6.15: Schéma řídicí karty SOS-AT. Modře jsou zvýrazněny zkratovací spojky, červeně třípinové konektory pro připojení servomotorů, žlutě konektor X1 a zeleně konektor X2. Převzato a upraveno z manuálu výrobce karty [39].

SOS-AT ke svému provozu potřebuje dvě napájecí napětí U1 a U2. Obě napětí jsou v rozsahu +4,8 až 6 V. Napájecí napětí U1 je určeno k napájení mikroprocesoru SOS-AT. Připojuje se na dva piny +U1 a GND čtyřpinového konektoru X1 (viz obr. 6.15). Napájecí napětí U2 slouží k napájení servomotorů a je připojeno na piny +U2 a GND konektoru X2. Druhé dva piny +SI a -SI konektoru X1 slouží k připojení kabelu sériové linky, která přenáší signály z počítače do SOS-AT. Tento kabel je na straně u počítače osazen konektorovou zásuvkou D-sub 9. Jelikož však řídicí počítač není vybaven klasickou sériovou linkou s D-sub 9 konektorem, ale je vybaven portem USB, musel být použit převodník USB - RS232. Pokud je sériová linka správně připojena, řídicí počítač spuštěn a karta SOS-AT má připojeno napájecí napětí, rozsvítí se červená signálka.

Řídící povely z počítače do karty SOS-AT mají formát tří po sobě jdoucích bytů. První byte je synchronizační a má vždy hodnotu FF. Druhý byte určuje číslo ovládaného serva a má tedy hodnoty 00 až 07. Třetí byte určuje pozici výstupního hřídele serva a má hodnoty 00 až FE. Řídící povely je třeba vysílat pouze tehdy, když je vyžadována změna polohy některého z servomotorů. Udržovací řídicí signály pro servomotory zajišťuje SOS-AT sám automaticky.

Servomotory se k řídicí kartě SOS-AT připojují třípinovými konektory S1 až S8. Aby nedocházelo při zapojování k záměně orientace kabelu servomotoru, jsou barvy jednotlivých žil kabelu u většiny výrobců sjednoceny. Záporný pól napájecího napětí (GND) bývá černý a zapojuje se na pin, který má na obrázku 6.15 tvar čtverce. Kabel s kladným pólem napájecího napětí (+U) bývá červený a zapojuje se na prostřední pin. Kabel vedoucí řídicí signál do servomotoru (PWM) nemá standardizovanou barvu, ale obvykle bývá bílý nebo žlutý [39].

Řídící signály o požadované pozici hřídele jsou z karty SOS-AT do servomotoru přenášeny formou pulzně šířkově modulovaných (PWM) signálů. Poloha výstupního hřídele serva odpovídá proporcionálně šířce řídicího impulsu. Řídící impuls je kladný s amplitudou +5 V a opakovací frekvencí obvykle 50 Hz (perioda 20 ms) nebo 60 Hz. Pro rozsah servomotorů nastavený na $\pm 45^\circ$ je aktivní šířka řídicích signálů 1 až 2 ms. V bioreaktoru byl mechanický rozsah hřídel servomotorů zvětšen vysunutím zkratovací spojky R na $\pm 90^\circ$. Pro tento rozsah se zvětší rozsah šířky řídicích signálů na 0,5 až 2,5 ms (viz obr. 6.16).

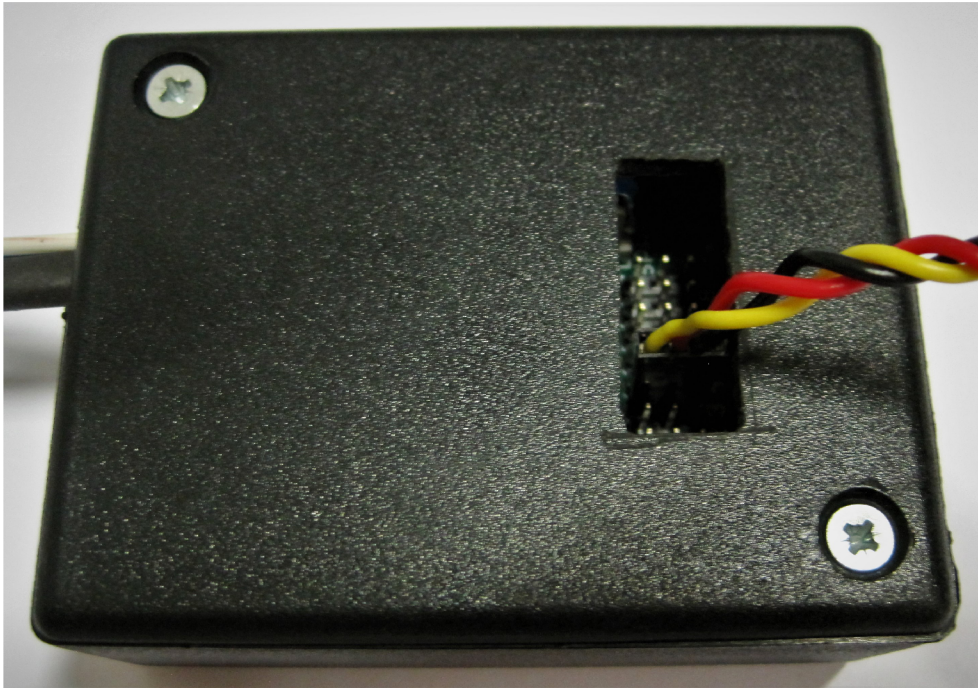


Obrázek 6.16: Příklady PWM signálů s různou šířkou pulzu. Nad každým pulzem je zakreslen servomotor s odpovídajícím natočením hřídele. Převzato z manuálu výrobce karty [39].

Aby byla karta SOS-AT chráněna před mechanickým poškozením, byla umístěna do plastového krytu (viz obr. 6.17).

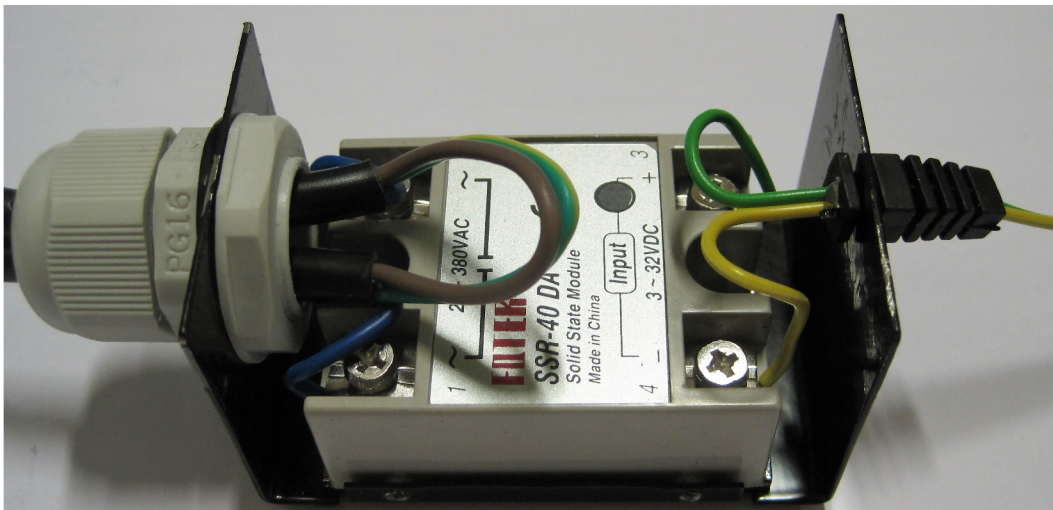
6.3.3. Spínací relé

Pro namíchání atmosféry se správným podílem oxidu uhličitého je v bioreaktoru použit mixér MX. Mixér MX míchá atmosféru z CO_2 z tlakové nádoby TN a ze vzduchu nasátého z místnosti vzduchovou pumpou OKO-AP VP [9]. Jak již bylo zmíněno v části 6.2.4, přívody obou plynů je nutné synchronizovaně vypínat a zapínat. Přívod CO_2 je spínán škrtidlem Š. Přívod vzduchu se standardně zapíná a vypíná přepínacím tlačítkem, které je umístěno zepředu vzduchové pumpy VP. Aby bylo možné pumpu VP spínat automaticky prostřednictvím obslužného softwaru, bylo k ní nainstalováno spínací solid state relé



Obrázek 6.17: Řídící karta SOS-AT umístěna v plastovém krytu. Tříbarevným kabelem je připojen jeden servomotor.

FOTEK SSR-40 DA. Napájecí kabel pumpy VP byl přerušen a mezi nově vzniklé konce bylo relé připojeno. Z důvodu ochrany relé a bezpečnosti obsluhy, bylo relé umístěno do kovového krytu (viz obr. 6.18).



Obrázek 6.18: Relé FOTEK SSR-40 DA.

Pro sepnutí relé a tedy i zapnutí pumpy VP je nutné přivést na svorky relé kladné stejnosměrné napětí v rozsahu +3 V až +32 V. V mém případě je použito napětí +5 V. Toto napětí je získáno z analogového výstupu karty National Instruments USB-6008, která je přes USB rozhraní připojena k řídicímu počítači. Zapojení pumpy VP, relé a NI karty je na obrázku 6.19.



Obrázek 6.19: Zapojení karty National Instruments USB-6008, relé FOTEK SSR-40 DA v kovovém krytu a vzduchové pumpy OKO-AP Okolab.

6.4. Software

Automatizované části bioreaktoru vyžadují programové ovládání. Pro tvorbu řídicího softwaru bylo z důvodu přehlednosti programu a rychlosti programování zvoleno prostředí LabView. Vytvořený software obsahuje tři vrstvy programů. Nejnižší vrstva programů komunikuje přímo s hardwarem. Každý z těchto programů řídí jednu z těchto komponent bioreaktoru:

- senzor ExplorIR®-M S,
- servomotor v pumpě PP_1 pro čerpání atmosféry,
- servomotor v pumpě PP_2 pro čerpání média,
- servomotor v přepínači hadiček PH,
- servomotor v přepínacím ventilu PV,
- škrtidlo Š pro spínání přívodu CO_2 a relé pro spínání vzduchové pumpy VP.

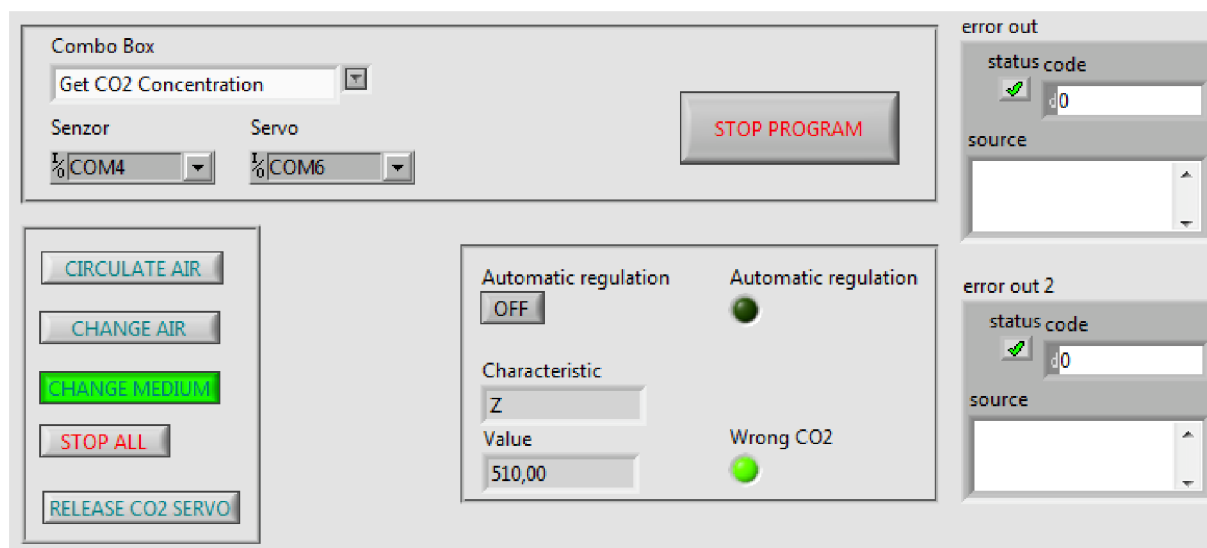
Škrtidlo Š a relé jsou řízeny jedním programem, protože jejich chod musí být kvůli namíchání správné koncentrace atmosféry synchronizovaný. Všechny tyto programy pro řízení hardwaru jsou použity v další vrstvě, kterou jsou programy čtyř pracovních módů bioreaktoru:

- cirkulace atmosféry,
- výměna atmosféry,
- výměna média,
- klid.

Třetí vrstva je program uživatelského rozhraní, který řídí celý bioreaktor.

6.4.1. Program uživatelského rozhraní

Program uživatelského rozhraní je určen pro uživatele pracujícího s bioreaktorem. Uspořádání čelního panelu tohoto programu je zřejmé z obrázku 6.20. V horní části čelního panelu musí uživatel vybrat, ke kterým portům je připojen senzor ExplorIR®-M a karta SOS-AT. V levé spodní části se nacházejí tlačítka pro přepínání pracovních módů bioreaktoru.

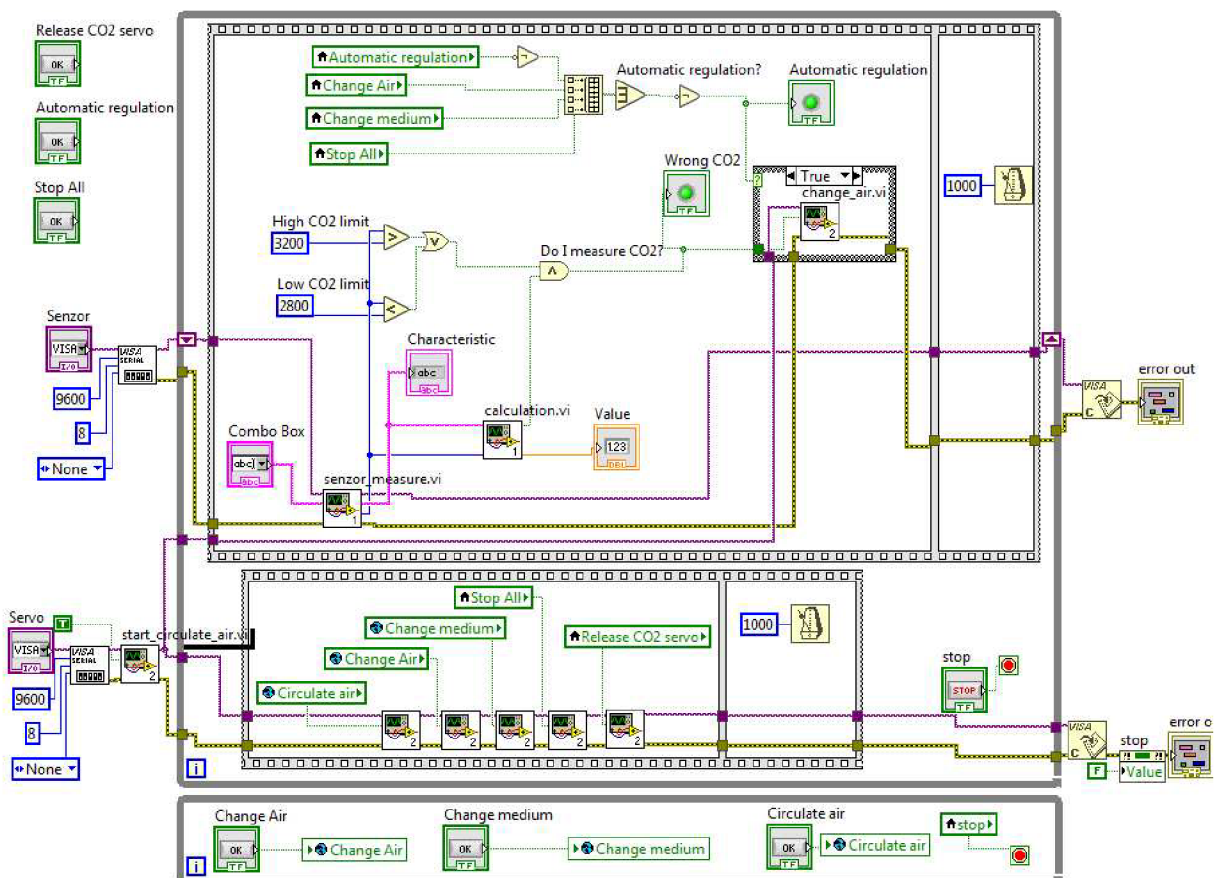


Obrázek 6.20: Čelní panel programu uživatelského rozhraní.

Prostřední spodní část čelního panelu je určena k ovládní senzoru ExplorIR®-M. Nachází se zde výběrové menu pro volbu měřené veličiny, tj. koncentrace CO₂, teplota, barometrický tlak a nebo relativní vlhkost. Pod výběrovým menu se v prvním okně zobrazuje zkratka měřené veličiny a ve druhém okně hodnota této veličiny. Dále se zde nachází tlačítka, které zapíná automatické řízení koncentrace CO₂. Po stisknutí tohoto tlačítka program na základě měřených hodnot koncentrace CO₂ sám přepíná mezi pracovními módy cirkulace a výměny atmosféry.

Blokový diagram programu uživatelského rozhraní je na obrázku ???. Program je založen na principu konečného stavového automatu, který disponuje třemi stavy. Prvním stavem je inicializace, při které dochází k zahájení komunikace se senzorem ExplorIR®-M a kartou SOS-AS. Dalším krokem inicializace programu je spuštění pracovního módu cirkulace atmosféry v bioreaktoru. Mód cirkulace atmosféry je totiž základní mód pro mikroskopování. Druhý stav programu uživatelského prostředí je tvořen smyčkou, která

obsahuje dvě sekvence. Horní z nich slouží k ovládání ExplorIR®-M senzoru a k automatické regulaci koncentrace oxidu uhličitého na základě změřených dat. Spodní sekvence slouží k řízení bioreaktoru pomocí tlačítek. Třetí stav programu slouží k ukončení běhu softwaru a k deaktivaci komunikace s hardwarem.



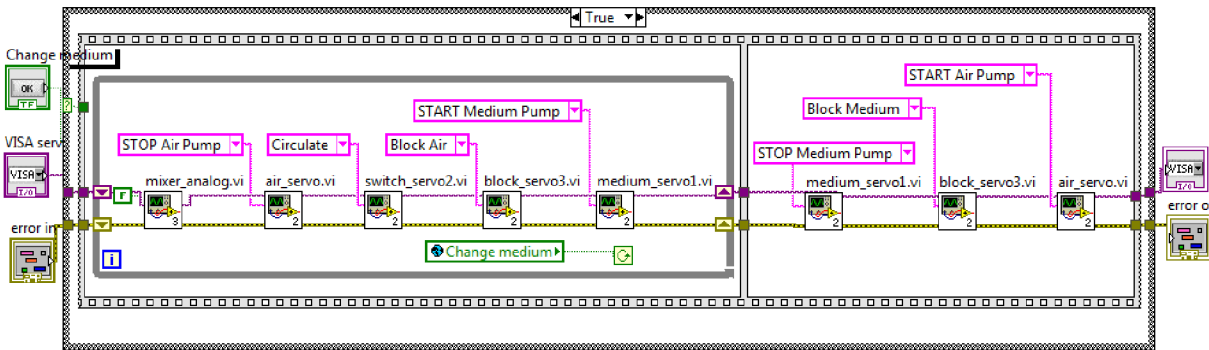
Obrázek 6.21: Blokový diagram programu uživatelského rozhraní.

6.4.2. Řízení bioreaktoru pomocí tlačítek

Ve spodní sekvenci programu uživatelského rozhraní je naprogramováno přepínání všech čtyř pracovních módů bioreaktoru pomocí tlačítek. Každé tlačítko je napojeno na vlastní program, který zapíná a vypíná odpovídající mód. Při běhu této sekvence je postupně kontrolována logická hodnota každého tlačítka. Tyto hodnoty vstupují do připojených programů módů a řídí je.

Všechny programy módů mají obdobnou strukturu blokového diagramu. Obsahují podmínkovou strukturu (True, False) řízenou logickým signálem z tlačítka. Příklad False neobsahuje žádné příkazy a nijak tedy nemění aktuální stav bioreaktoru. Příklad True je v jednotlivých programech trochu odlišný. V programech pro výměnu atmosféry a výměnu média obsahuje případ True sekvenci, která je na obrázku obr. 6.22. V prvním okně této sekvence jsou takové pokyny pro servomotory a relé, aby dohromady svou činností spustily požadovaný pracovní mód. Tyto pokyny jsou uzavřeny v podmínkové smyčce While a jsou tedy vykonávány po celou dobu, co je tlačítko zmáčknuté. Po vypnutí tlačítka,

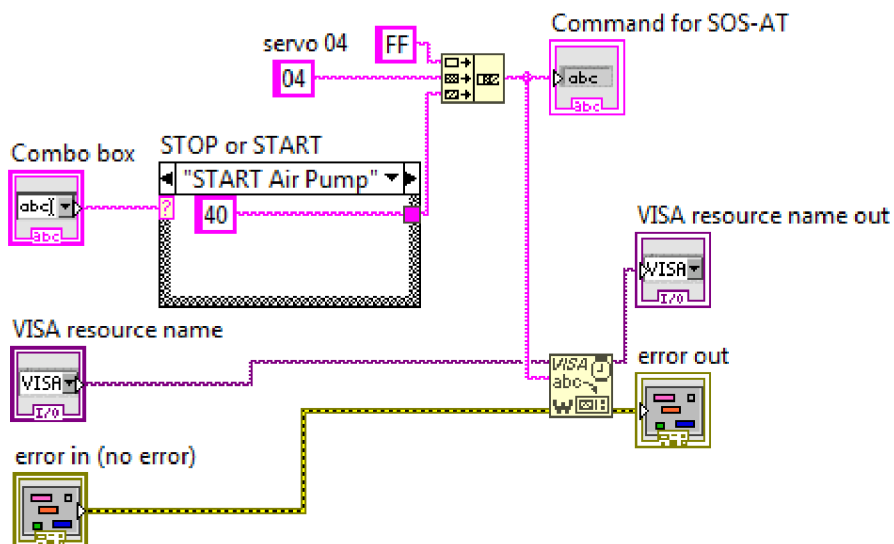
ukončí program běh podmínkové smyčky a vykoná příkazy v druhém okně sekvence. Tyto příkazy ukončí příslušný mód a přepnou bioreaktor zpět do základního módu cirkulace vzduchu.



Obrázek 6.22: Blokový diagram programu pro spínání módu výměny média.

Programy pro zapnutí cirkulace atmosféry, pro klid (tlačítko STOP ALL) a pro uvolnění škrtdla neobsahují případy True sekvenci ani podmínkovou smyčku. Pokyny pro servomotory a relé jsou umístěny přímo v případě True. Pracovní mód pro cirkulaci atmosféry trvá dokud servomotory a relé nedostanou jiné pokyny. Pracovní mód klidu trvá tak dlouho dokud je stisknuté tlačítko STOP ALL.

Jak již bylo zmíněno na začátku části 6.4 a jak je zřejmé z obrázku 6.22, programy módů obsahují programy, které komunikují s hardwarem. Blokové schéma jednoho z těchto programů je na obrázku 6.23. V programech pro řízení servomotorů lze nastavit rychlosti otáček a tím přenastavit rychlosti čerpání média a vzduchu. Změny je však nutné provést přímo v blokových diagramech programů.



Obrázek 6.23: Čelní panel programu uživatelského rozhraní.

6.4.3. Automatická regulace oxidu uhličitého

Horní plochá sekvence v blokovém diagramu programu uživatelského rozhraní zajišťuje řízení a vyčítání senzoru ExplorIR®-M a také automatickou regulaci koncentrace CO₂ na základě změřených dat. Automatická regulace oxidu uhličitého probíhá pouze tehdy, když jsou splněny všechny následující podmínky. Za prvé ve výběrovém menu je zvolena jako veličina k měření koncentrace CO₂. Za druhé je zapnuté tlačítko pro automatickou regulaci. A za třetí není tlačítkem spuštěna ani výměna atmosféry, ani výměna vzduchu a ani není vyžadovaný klid. Díky těmto podmínkám software vždy upřednostní řízení tlačítka před automatickým řízením na základě dat ze senzoru. Výjimkou je mód cirkulace atmosféry. Ten je považován za základní mód a není upřednostňován před automatickým řízením.

Samotná regulace CO₂ probíhá tak, že program porovnává naměřenou hodnotu CO₂ se zadaným spodním a horním limitem. A pokud je aktuální koncentrace mimo limity, přepne bioreaktor do módu výměny atmosféry. Tento mód probíhá tak dlouho, dokud se koncentrace CO₂ nevrátí do povolených mezí. Poté co je mód výměny atmosféry ukončen, přepne se bioreaktor zpět do módu cirkulace atmosféry.

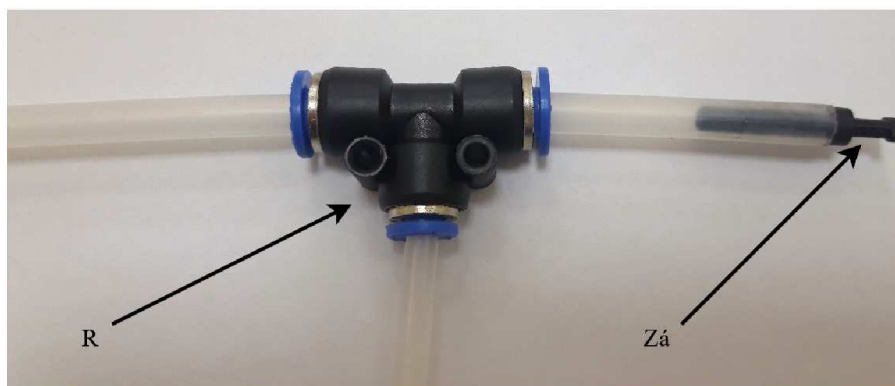
7. Testování bioreaktoru

Po zrealizování celého bioreaktoru se systém bioreaktoru ladil, testovala se jeho funkčnost a ověřovala se netoxičnost použitých materiálů. Nejdříve bylo nutné zjistit správné hodnoty natočení hřídelí servomotorů v přepínači hadiček PH, v přepínacím ventilu PV a v škrtidle Š. U peristaltických pump PP_1 a PP_2 bylo nutné nastavit správné rychlosti otáčení a zjistit, při jakých vstupních příkazech se pumpy PP zastaví. Všechny zjištěné hodnoty byly zadány do obslužného softwaru.

Na mixéru atmosféry MX se manuálně nastavuje průtok vzduchu z pumpy VP a průtok oxidu uhličitého z tlakové nádoby TN. Průtok vzduchu byl nastaven na 1 nl/min a průtok CO_2 na 0,03 nl/min. Tyto průtoky zajistí výslednou atmosféru s koncentrací zhruba 3% CO_2 . Což bylo také otestováno a potvrzeno. Během testování správné koncentrace atmosféry z mixéru MX bylo současně také kontrolováno, že naprogramovaná automatická regulace atmosféry funguje správně. Tzn. pokud koncentrace CO_2 byla mimo povolené meze, automaticky se spustila výměna atmosféry, a když byla správná koncentrace obnovena, výměna atmosféry se vypnula. Povolené meze byly nastaveny na 2,8% a 3,2%. Během testování se však ukázalo, že škrtidlo Š nedokáže hadičku s oxidem uhličitým zcela uzavřít a navíc se servomotor při práci značně zahřívá. Podobné problémy s nedostatečným zmáčknutím hadiček a přehříváním servomotoru se později objevily i u přepínače hadiček PH. I přes tyto problémy testování proběhlo a míchání atmosféry se ozkoušelo. Avšak do budoucna škrtidlo Š i přepínač PH vyžadují použití silnějších servomotorů a případně i změnu svého designu.

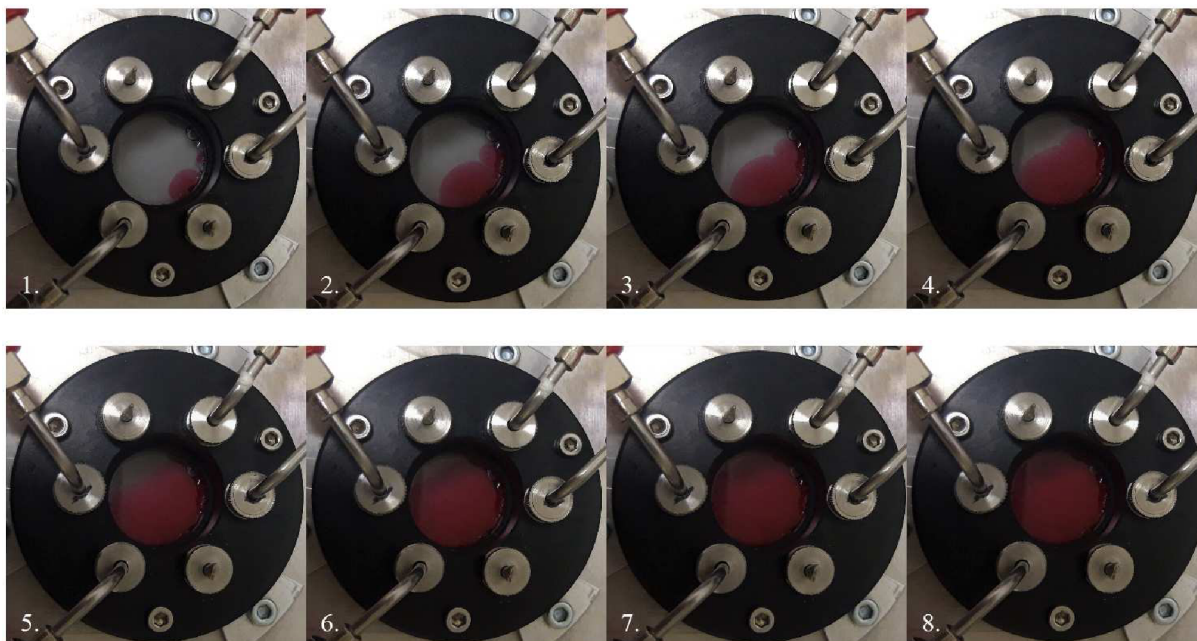
Při testování cirkulace atmosféry se ukázalo, že nová atmosféra se nenasává z portu P_1 , ale namísto toho se nasává médium z portu P_2 . To bylo jednak způsobeno tím, že přepínač hadiček PH nedokázal hadičku s médiem zcela zaškrtit, jak bylo zmíněno výše. A dále kvůli tomu, že infuzní set IS obsahuje membránu, která kladla příliš velký odpor průtoku vzduchu. Problém s nasáváním ze špatného portu byl napraven tím, že v přepínači PH byly původní hadičky s vnitřním průměrem 4 mm nahrazeny hadičkami s vnitřním průměrem 1,6 mm. Tyto nové hadičky přepínač PH dokáže zcela zaškrtit, nicméně kvůli jejich silnějším stěnám se servomotor přepínače PH při práci značně zahřívá. Díky použití hadiček s menším vnitřním průměrem se značně zmenšil „mrtvý objem“ hadičky, tzn. množství média nasáté v hadičce mezi komorou PK a zásobníkem N_1 . Infuzní set IS, který sloužil k přidávání činidel, byl nahrazen rozdvojkou R tvaru „T“ (viz obr. 7.1). Jeden port rozdvojkou R bude během provozu uzavřen zátkou $Zá$ a otevře se pouze při přidávání činidla, které se vstříkne přímo do systému hadiček.

Testování výměny média v pozorovací komoře PK bylo provedeno s čistou vodou a vodou sytě obarvenou fenolovou červení. Nejdříve byla Petriho miska PM manuálně naplněna 2 ml čisté vody. Miska PM byla poté vložena do pozorovací komory PK bioreaktoru. Konec hadičky z portu P_2 byl ponořen do zásobníku N_1 s fenolovou červení. Po spuštění výměny média se voda z komory PK začala odsávat čerpadlem PP_2 do odpadní nádoby N_2 a fenolová červeň se začala nasávat ze zásobníku N_1 . Na obrázku 7.2 je série po sobě jdoucích fotografií zachycujících tuto výměnu kapalin. Celá výměna kapalin trvala asi 20 s, včetně času potřebného na dopravu kapaliny ze zásobníku N_1 do komory PK skrz hadičku.



Obrázek 7.1: Rozdvojka R sloužící k přidávání činidel do systému bioreaktoru. Port pro přidávání činidel je uzavřen zátkou Z_á.

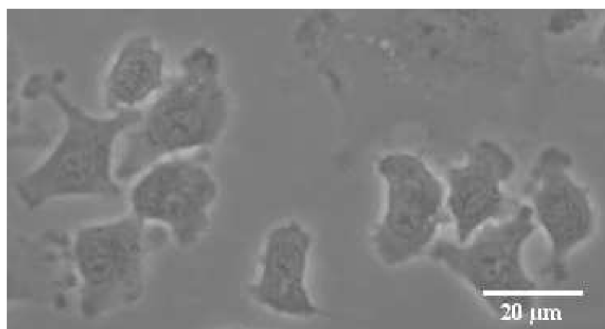
Použitá hadička měla vnitřní průměr 1,6 mm a délku asi 30 cm. Tato tenká hadička byla k jehle komory PK připojena tlustší hadičkou o vnitřním průměru 4 mm a délce asi 4 cm. Objem média v obou hadičkách byl asi 1 ml. Pokud by byl bioreaktor nainstalován na mikroskop CCHM, vzdálenost mezi zásobníkem N₁ a komorou PK by byla větší a doba výměny by se tedy prodloužila. Výměna obou kapalin byla několikrát zopakována. Zásobníky N₁ s dodávanou kapalinou byly vyměňovány manuálně. Při výměně bylo nutné dávat pozor, aby se hadička nezavzdušnila, jinak se do pozorovací komory PK dostaly vzduchové bubliny.



Obrázek 7.2: Testování výměny kapalin v pozorovací komoře PK bioreaktoru. Čistá voda je vyměňována za vodu obarvenou fenolovou červení. Interval mezi jednotlivými snímky je zhruba 1 s.

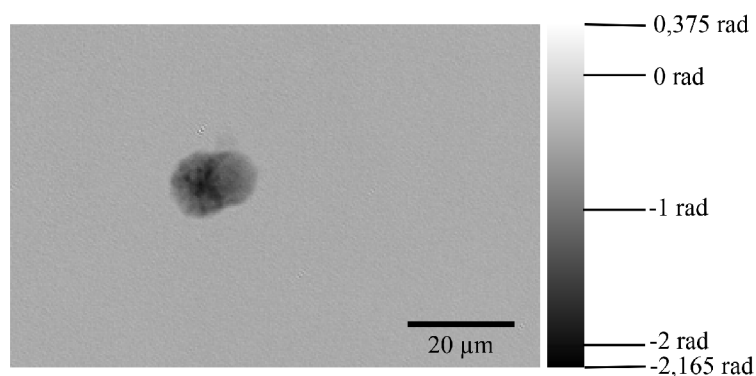
Netoxičnost použitých materiálů bioreaktoru byla ověřována na buňkách fibrosarkomu inbredního potkana Lewis. Buňky byly nasazeny do Petriho misky PM, přikryty horním dílem HD pozorovací komory a byly umístěny na noc do inkubátoru. Další den byly buňky

zkontrolovány na klasickém optickém mikroskopu. Buňky byly živé a zřejmě v dobrém stavu (viz obr.7.3). Z toho lze usuzovat, že plast, ze kterého je komora PK vyrobena, a lepidlo použité pro přilepení sklíčka nejsou pro buňky toxické. Na obrázku 7.3 je také možno vidět, že pozorovací komora je dostatečně opticky kvalitní.



Obrázek 7.3: Buňky fibrosarkomu inbredního potkana Lewis.

Optická kvalita pozorovací komory byla také ověřována na mikroskopu CCHM. V komoře byly pozorovány buňky lidského karcinomu plic z linie A549. Na obr. 7.4 je fázový snímek jedné buňky. Jelikož buňky byly v suspenzi, byla zaostřena pouze tato jedna buňka a ostatní buňky byly mimo rovinu ostrosti. Do budoucna bude na mikroskopu CCHM probíhat hlubší testování funkcí systému bioreaktoru a dlouhodobé ověřování jeho stability a spolehlivosti.



Obrázek 7.4: Fázový snímek buňky lidského karcinomu plic z linie A549 pořízený na CCHM.

Závěr

V této práci byly popsány kultivační podmínky živých buněk (médium, teplota, atmosféra) a byly shrnuty možnosti jejich řízení během pozorování na optických mikroskopech. Možnosti řízení kultivačních podmínek byly ukázány na konkrétních komerčně dostupných zařízeních. A u těchto zařízení bylo poté posouzeno, zda splňují nároky metody QPI a jestli některé z nich vyhovuje aktuálním potřebám Laboratoře experimentální biofotoniky. Mikroskop CCHM používaný v této laboratoři disponuje inkubační komorou, která udržuje stabilní fyziologickou teplotu vzorku a současně temperuje celý mikroskop. V současné době však CCHM není vybaven obslužným příslušenstvím, které by zajišťovalo výměnu média a atmosféry. Proto bylo navrženo a zrealizováno automatizované kultivační zařízení (bioreaktor). Ten zajišťuje tyto funkce:

- výměnu krmného média v pozorovací komoře,
- cirkulaci a výměnu atmosféry,
- přidávání činidel do pozorovací komory,
- měření koncentrace oxidu uhličitého v atmosféře,
- automatickou výměnu atmosféry v případě, že se koncentrace oxidu uhličitého dostane mimo povolené meze.

Pro realizaci bioreaktoru bylo nutné navrhnout a vyrobit několik vlastních mechanických částí a také připojit komerční mechanické i elektronické komponenty. Pro řízení celého bioreaktoru byl vytvořen obslužný software v prostředí LabView. Do budoucna bude upraven design některých komponent, například přepínače hadiček a škrtidla. A poté budou funkce bioreaktoru podrobněji testovány a na CCHM bude probíhat jeho dlouhodobé testování.

Literatura

- [1] NIKON INSTRUMENTS Inc., <https://www.microscopyu.com/applications/live-cell-imaging/live-cell-imaging-culture-chambers>, [Online; 31. Března 2020].
- [2] VEJRAŽKA, M. Buněčné kultury. Ústav lékařské biochemie, 1. lékařská fakulta Univerzity Karlovy v Praze. Dostupné z: <http://bioprojekty.lf1.cuni.cz/3381/sylaby-prednasek/textova-verze-prednasek/bunecne-kultury-vejrazka.pdf>.
- [3] JAFFRIN, M. Y., SHAPIRO, A. H. Peristaltic pumping. *Annual Review of Fluid Mechanics*, ročník 3, č. 1 1971, s. 13–37.
- [4] HINA, S., MUSTAFA, M., HAYAT, T. Peristaltic Motion of Johnson-Segalman Fluid in a Curved Channel with Slip Conditions. *PLoS ONE* [online], ročník 9, č. 12 2014. Doi:10.1371/journal.pone.0114168 URL: <http://search.proquest.com/docview/1846408854/>.
- [5] LOUDIN, T. Peristaltic Pump Evolution. *Power Engineering*, ročník 115, č. 1 2011, s. 58–60. ISSN 00325961. Dostupné z: <http://search.proquest.com/docview/848944169/>.
- [6] Volk, M. W. *Pump characteristics and applications*. 3rd Edition. Boca Raton: CRC Press, 2014. ISBN 9781466563087.
- [7] FIEDLER SCIENTIFIC INSTRUMENT, <http://www.pristroje.cz/>, [Online; 12. dubna 2020].
- [8] CHERRY BIOTECH, <https://www.cherrybiotech.com/>, [Online; 20. března 2020].
- [9] OKOLAB, <http://www.oko-lab.com/>, [Online; 16. dubna 2020].
- [10] OPTIXS, www.optixs.cz, [Online; 16. dubna 2020].
- [11] BROOK INDUSTRIES, http://brookindustries.net/index.php?p=1_7_Warming-Stage-for-Inverted-Microscopes, [Online; 14. dubna 2020].
- [12] IBIDI. Instruction Manual Ibidi Heating System, Universal Fit. 2019. Dostupné z: https://ibidi.com/img/cms/products/instruments/I_109XX_HeatingSystem/I_1091X_Heating_Universal/IN_10918_HeatingSystem_UF_1Chamber.pdf.
- [13] INSTITUTE FOR CONTINUING EDUCATION. Principles of Humidification. <http://ceu.org/cecourses/z98107/ch3d.htm>, [Online; 20. dubna 2020].
- [14] URBANI, F., SQUADRITO, G., BARBERA, O., a kol. Performance of bubble gas humidifiers and evaluation of relative humidity in PEFC. Istituto di Tecnologie Avanzate per l'Energia "Nicola Giordano" del C.N.R. Září 2003.

- [15] IBIDI, <https://ibidi.com>, [Online; 19. března 2020].
- [16] BAKER, F. L., BAUMANN, J. H. Controlled environment incubator for light microscopy. U.S. Patent No. 4301252. dostupné z: <https://patentimages.storage.googleapis.com/be/00/60/cf54684279a26a/US4301252.pdf>.
- [17] ESSER, P. pH and Pressure in Closed Tissue Culture Vessels. Thermo Scientific, 2010.
- [18] BIOPTECHS, <https://bioptechs.com/>, [Online; 20. března 2020].
- [19] FLUIGENT, www.fluigent.com/product/microfluidic-components-3, [Online; 20. března 2020].
- [20] IBIDI. Instruction Manual Ibidi Gas Incubation System. 2019. Dostupné z: ibidi.com/img/cms/products/instruments/I_1092X_Gas_Incubation/IN_1192X_ibidi_Gas_Mixer.pdf.
- [21] IBIDI. Instruction Manual Ibidi Pump System. 2019. Dostupné z: https://ibidi.com/img/cms/products/instruments/I_1090X_PumpSystem/IN_1090X_pump_system.pdf.
- [22] ELVEFLOW, <https://www.elflow.com/>, [Online; 20. března 2020].
- [23] MICRONIT, <https://www.micronit.com/>, [Online; 20. března 2020].
- [24] SLABÝ, T., KOLMAN, P., DOSTÁL, Z., a kol. Off-axis setup taking full advantage of incoherent illumination in coherence-controlled holographic microscope. *Optics express*, ročník 21, č. 12 2013, s. 14747–14762. Doi:10.1364/OE.21.014747.
- [25] TESCAN. Q-PHASE Live Cell Imaging. 2015. Dostupné z: http://library.tescan.com/attachments/article/90/AE-151011_TESCAN_q-phase_live_cell_imaging.pdf.
- [26] EXPERIMENTAL BIOPHOTONICS, <https://http://biophotonics.ceitec.cz/>, [Online; 28. března 2020].
- [27] KOLMAN, P. *Koherencí řízený holografický mikroskop*. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta strojního inženýrství, 2010. Vedoucí práce doc. RNDr. Radim Chmelík, Ph.D.
- [28] LEITH, E. N., UPATNIKES, J. Holography with Achromatic-Fringe Systems. *J. Opt. Soc. Am.*, ročník 57, č. 8 1967, s. 975–979. Doi:10.1364/JOSA.57.000975.
- [29] DOSTÁL, Z., SLABÝ, T., KVASNICA, L., a kol. Automated alignment method for coherence-controlled holographic microscope. *Journal of Biomedical Optics*, ročník 20, č. 11 2015, str. 111215. Doi: 10.1117/1.JBO.20.11.111215. Dostupné z: <https://doi.org/10.1117/1.JBO.20.11.111215>.

- [30] KVASNICA, L. *Řízení optického stolku interferenčního mikroskopu na základě obrazové fáze*. Brno, 2008. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta strojního inženýrství. Vedoucí práce doc. RNDr. Radim Chmelík, Ph.D.
- [31] BARER, R. Interference Microscopy and Mass Determination. *Nature*, ročník 169, 1952, s. 366–367. ISSN: 0028–0836. Doi: 10.1038/169366b0. Dostupné z: <http://www.nature.com/doi/10.1038/169366b0>.
- [32] ČOLLÁKOVÁ, J. *Průtokové komůrky pro mikroskopii živých buněk*. Brno, 2011. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta strojního inženýrství. Vedoucí diplomové práce Ing. Martin Antoš, Ph.D.
- [33] UHLÍŘOVÁ, H. *Mikroskopie časově proměnných biologických objektů*. Brno, 2010. Disertační práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta strojního inženýrství. Vedoucí disertační práce prof. RNDr. Radim Chmelík, Ph.D.
- [34] S.A.B. IMPEX, <https://www.sab-medical.com/>, [Online; 30. května 2020].
- [35] MASTERFLEX, www.masterflex.com, [Online; 29. května 2020].
- [36] FISHER SCIENTIFIC, <https://www.fishersci.co.uk/shop/products/>, [Online; 29. května 2020].
- [37] HITEC, hitecrd.com/products/servos/giant-servos/analog-giant-servos/hs-805mg/product, [Online; 29. května 2020].
- [38] EBOTICS, www.ebotics.com/activity/project-no-3-control-the-servomotor, [Online; 29. května 2020].
- [39] HOBBYROBOT. Obsluha a programování SOS-AT., s. Dostupné z: http://www.hobbyrobot.cz/wp-content/uploads/SOS--AT_manual.pdf, [Online; 31. května 2020].
- [40] P-LAB, www.p-lab.cz, [Online; 20. března 2020].
- [41] CO2METER.COM, <https://www.co2meter.com/>, [Online; 6. června 2020].
- [42] AMPHENOL, www.amphenol-sensors.com/en/product-spotlights/3424-co2-sensing-cell-incubators, [Online; 6. června 2020].
- [43] CO2METER.COM. GSS Sensor User's Manual. 2015. Dostupné z: http://co2meters.com/Documentation/Manuals/Manual_GC_0024_0025_0026_Revised8.pdf.