
**ПРИБОРОСТРОЕНИЕ ДЛЯ БИОЛОГИИ
И МЕДИЦИНЫ**

УДК 575.086.8

© В. В. Шугайло, С. А. Костенко, Ю. С. Медникова

**ПРИБОР ДЛЯ ТЕРМОСТАБИЛИЗАЦИИ КЮВЕТЫ
С ЖИВЫМИ КЛЕТКАМИ**

Широкое использование клеточных технологий в современных биологических и прикладных исследованиях требует наличия устройства, позволяющего проводить операции с живыми клетками в оптимальных для них условиях. В Институте биологического приборостроения с опытным производством РАН (ИБП РАН) разработан и изготовлен "Прибор для термостабилизации кюветы с живыми клетками", позволяющий оптимизировать температуру жидкостей в кювете с клетками и эмбрионами теплокровных. Конструкция кюветы позволяет вводить в клетки электроды для измерения их электрических параметров. Прибор состоит из двух частей: контроллера и термостоллика с кюветой. Термостоллик может быть установлен на предметный столик микроскопа или на стол под лупой. Освещение производится снизу кюветы. Температура кюветы может быть установлена от 10 до 50 °С. Точность поддержания температуры ± 0.1 °С.

Кл. сл.: кювета, термостабилизация, клетка, эмбрион, прибор, элемент Пельтье

ВВЕДЕНИЕ

Исследование живых клеток и эмбрионов позволяет определить их жизнеспособность визуально и измерить электрофизиологические параметры в оптимальных условиях. При этом необходимо установить и поддерживать необходимую температуру кюветы с клетками длительное время, до нескольких часов, наблюдая за живыми объектами визуально [1]. Разработанный прибор предназначен для создания в кювете с живыми клетками необходимой температуры среды и поддержания ее длительное время. Поскольку прибор предназначен для работы с клетками теплокровных, то диапазон задаваемых температур выбран в интервале от 10 до 50 °С с точностью ее поддержания ± 0.1 °С в лабораторных условиях. Данная разработка является продолжением работы над прибором для термостатирования клеток и эмбрионов, созданного в ИБП РАН ранее [2].

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ПРИБОРА

Прибор состоит из двух блоков — контроллера и термостоллика. Термостоллик выполнен в виде медного теплообменника, нагреваемого или охлаждаемого при помощи элементов Пельтье, закрепленных рабочими поверхностями на теплообменнике с двух сторон. Управление нагревом/охлаждением производится изменением тока элементов Пельтье от контроллера по линейному закону. Такое управление не является оптималь-

ным с точки зрения энергетике, однако в этом случае резко уменьшаются возможные помехи на электродах, подключенных к измеряемым клеткам. К нерабочим поверхностям элементов Пельтье подсоединены радиаторы, обеспечивающие необходимый градиент температур элементов Пельтье. При необходимости радиаторы охлаждаются микроветилляторами, включаемыми контроллером. В теплообменник вмонтирован датчик температуры, в качестве которого используется платиновый термометр-сопротивление марки HEL-705-U-12-C2, калиброванный изготовителем при 0 °С и 100 °С. Сопротивление датчика при 20 °С около 1 кОм. Изготовитель — фирма Honeywell (США). Термостоллик соединен с контроллером кабелем длиной 1.5 м. Теплообменник выполнен из красной меди в виде буквы "Н", на боковых стенках стоят элементы Пельтье с радиаторами и вентиляторами, в горизонтальной части расположено отверстие для осветителя кюветы и сама кювета. Ее конструкция может быть различной в зависимости от задач и требуемого объема. Мы использовали прямоугольную кювету из оргстекла размером 45×60×20 мм с внутренней полостью для биообъектов и штуцерами для залива в кювету жидкости, закрепленную за счет трения между стенками теплообменника. Такая конструкция была разработана для решения задач Института высшей нервной деятельности РАН (ИВНД РАН). Несмотря на низкую теплопроводность оргстекла, работа с такой кюветой позволила получить все заданные параметры прибора, как показали проведенные испытания.

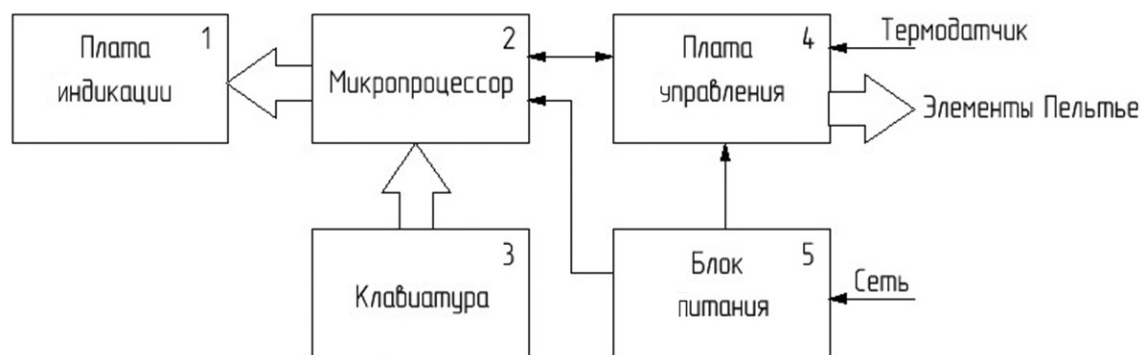


Рис. 1. Структурная схема блока термостатирования (контроллера)

При малых объемах исследуемого вещества возможно применение стеклянных кювет меньшего размера, устанавливаемых на теплообменник с площадью 46×60 мм и фиксируемых плоскими пружинами.

Контроллер прибора собран на микропроцессоре фирмы Atmel. Структурная схема контроллера (блока термостатирования) показана на рис. 1, общий вид прибора — на рис. 2.

На микропроцессор 2 приходят команды установки температуры от кнопок клавиатуры 3 и сигнал текущей температуры кюветы от термодатчика через плату управления 4. Эта информация отображается на жидкокристаллическом индикаторе (ЖКИ) платы индикации 1. Датчик температуры запитан стабильным током от генератора тока платы управления 4, полученное напряжение, пропорциональное температуре, нормируется этой же платой из расчета 0 °С — 0 В, 100 °С — 2.56 В и сравнивается процессором с заданным кодом с клавиатуры. Процессор выдает сигнал "Нагрев" или "Охлаждение" и сигнал разницы текущей и установленной температуры "Ошибка" в виде ШИМ на плату 4. Одновременно эта информация отображается на плате индикации 1. При равенстве температур прибор переходит в режим стабилизации температуры кюветы. На индикаторе появляется надпись "Работа". Эти сигналы преобразуются платой 4: сигналы "Нагрев" и "Охлаждение" управляют твердотельными ключами, переключающими полярность напряжения для элементов Пельтье. Сигнал "Ошибка" преобразуется в аналоговый сигнал управления генератором тока для элементов Пельтье. Все устройства прибора питаются от импульсного блока питания 5 напряжением 12 В.

ОСНОВНЫЕ ПАРАМЕТРЫ ПРИБОРА И ОПЫТ ЕГО ПРИМЕНЕНИЯ

1. Прибор состоит из двух блоков — термостол и контроллер, соединенные кабелем. Длина кабеля 1.5 м.
2. Диапазон стабилизируемых температур (10÷50) °С.
3. Дискретность установки температуры 0.1 °С.
4. Точность поддержания заданной температуры в кювете после прогрева в течение 30 мин ±0.1 °С.
5. При питании прибора — от сети (100÷240) В, ток менее 1.2 А (AC/DC).
6. Размер контроллера — 230×220×86 мм, столика — 145×100×60 мм.
7. Размер площадки для кюветы 46×60 мм.

В зависимости от размеров биообъектов в кювете термостол может быть установлен как на столе под линзой, так и на предметном столике микроскопа, обеспечивающего возможность его размещения. Посадочное место термостолика 46×60 мм. Крепление прибора, тип и конструкция кюветы определяются решаемой задачей.

Технические возможности прибора, не оговоренные в паспорте, и его работу с реальными биообъектами проверяли в Институте высшей нервной деятельности РАН (ФГУН РАН, г. Москва).

Прибор был установлен на столе под линзой. Изготовленная из оргстекла кювета размером 46×60×20 мм вставлялась между вертикальными стенками теплообменника. Подсветка производилась снизу. Кювета заполнялась дистиллированной водой. Температура жидкости измерялась электронным термометром типа VWRTraceable (США). Измерения проводились при комнатной температуре 24 °С. Испытания проводились ведущим научным сотрудником ИВНД РАН д.б.н. Ю.С. Медниковой.

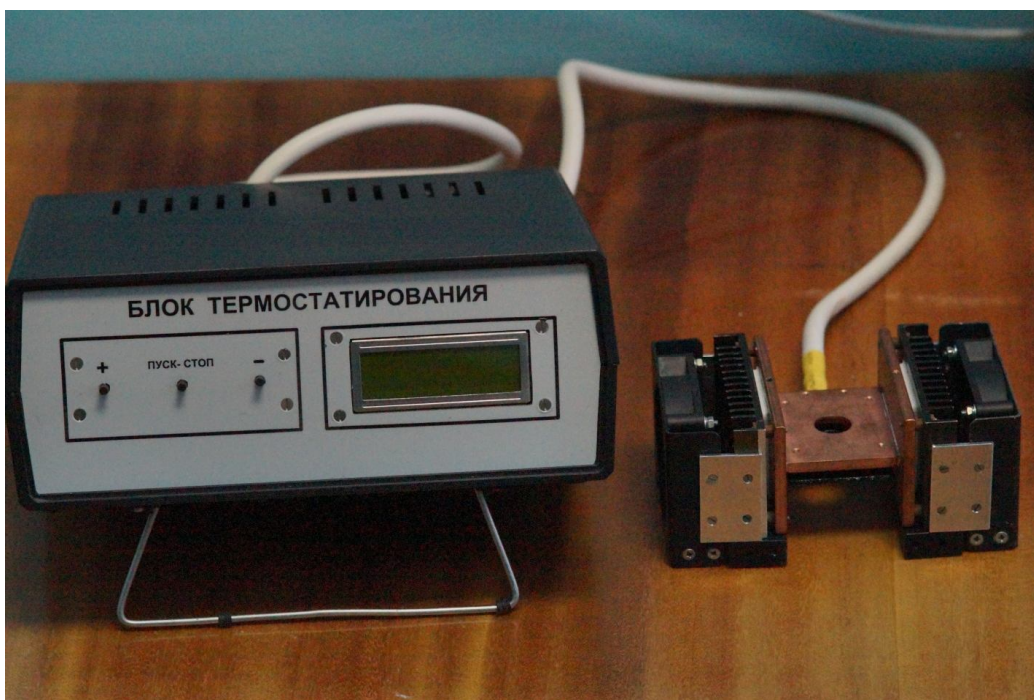


Рис. 2. Общий вид прибора для термостабилизации кюветы с живыми клетками

При помощи клавиатуры устанавливалась требуемая температура, прибор включался в режим нагрева или охлаждения, соответствующая надпись возникала на индикаторе. Измерялось время от пуска до достижения нужной температуры теплообменником, когда появлялась надпись "Работа". Это время зависело от разности заданной температуры и температуры окружающей среды и составляло в разных режимах не более 1 мин. Температура жидкости в кювете отстает от температуры теплообменника из-за конечной теплопроводности кюветы. Возникающая начальная разность температур (ошибка) составила при нагревании до 30 °С — 2 °С, при нагреве до 45 °С — 5 °С. При охлаждении до 20 °С ошибка составила 0 °С, при охлаждении до 17 °С — 1.5 °С, при охлаждении до 12 °С — 3 °С. Было измерено время установления заданной температуры жидкости в кювете в режиме "Работа". Это время оказалось порядка 30 мин.

Измеренная нестабильность температуры в кювете в течение 9 ч оказалось не более ± 0.1 °С.

Выяснилось, что для ускорения нагрева кюветы можно увеличить установку температуры выше заданной, более чем на 6 °С, а затем провести охлаждение до нужной температуры. При этом необходимая температура установится в кювете примерно за 8 мин, а не за 25÷30 мин, как при

стандартной методике. В принципе, при необходимости более быстрого нагрева жидкости в кювете может быть разработана специализированная кювета с большей теплопроводностью и меньшей массой.

Как уже упоминалось, в ИВНД РАН была проведена проверка прибора на реальных биообъектах. Разработанный нами прибор для термостабилизации кюветы был использован в экспериментах на срезах сенсомоторной коры морских свинок для изучения активности нервных клеток V слоя с целью выявления особенности функционирования нейронов, связанных с вероятным эволюционным приобретением теплокровности. Изменение температуры инкубации позволило получить интересные данные по изменению частоты импульсной активности различных нейронов и амплитуды спайков.

В заключение отметим, что имеющийся в ИБП РАН комплект документации позволяет производить прибор малыми сериями.

ВЫВОДЫ

1. Прибор удобен в работе, его характеристики (быстродействие и точность стабилизации температуры) достаточны для решения задач исследования живых биообъектов.

2. Разработанный прибор может быть использован в биологических и медицинских лабораториях для термостабилизации кюветы с реальными живыми объектами.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Шугайло В.В., Никитин В.А.* Методы и приборы для клеточных исследований в биологии. Германия, изд-во LAP LAMBERT Academic Publishing, 2012. 92 с.
2. *Шугайло В.В., Костенко С.А.* Прибор для термостатирования клеток и эмбрионов // Материалы шестой Международной конференции "Актуальные проблемы биологии в животноводстве", г. Боровск, 2015. С. 202–203.
3. *Годухин О.В., Малахова В.И., Калемнев С.В.* Динамика функционального состояния переживающего среза мозга и факторы, вызывающие его нарушение // Успехи физиологических наук. 1992. Т. 23, № 1. С. 40–57.

Институт биологического приборостроения с опытным производством РАН, г. Пущино Московской области (Шугайло В.В., Костенко С.А.)

Институт высшей нервной деятельности РАН, г. Москва (Медникова Ю.С.)

Контакты: *Шугайло Владислав Владимирович*,
lab12ibr@bk.ru

Материал поступил в редакцию: 7.07.2017

DEVICE TO PROVIDE STABLE TEMPERATURE IN A DISH CONTAINING LIVING CELLS

V. V. Shugailo¹, S. A. Kostenko¹, Yu. S. Mednikova²

¹*Institute for Biological Instrumentation with Manufacturing Facilities of the RAS, Pushchino, Moscow region, Russia*

²*Institute for Higher Nervous Activity of the RAS, Moscow, Russia*

The wide use of cellular technologies in modern biological research and applied studies requires a device enabling operations with living cells under optimal conditions for the last. The Institute for Biological Instrumentation with Manufacturing Facilities of the Russian Academy of Sciences (IBI RAS) has developed and built a "Device to provide stable temperature in a dish containing living cells" enabling provision of optimal temperatures in a dish containing cells and embryos of warm-blooded animals. The construction of the dish enables insertion of electrodes into the cells for measuring their electrical parameters. The device comprises two elements: a controller and a thermostage with a dish. The thermostage can be mounted onto a microscopic stage or onto a table with the use of a magnifier. Illumination is provided from the dish bottom. The dish temperature can be assigned from 10 to 50 °C. Accuracy of temperature maintaining is ± 0.1 °C.

Keywords: dish, temperature stabilization, cell, embryo, device, Peltier element

REFERENCES

1. Shugaylo V.V., Nikitin V.A. *Metody i pribory dlya kletchnykh issledovaniy v biologii* [Methods and devices for cell-like researches in biology]. Germany, LAP LAMBERT Academic Publishing, 2012. 92 p. (In Russ.).
2. Shugaylo V.V., Kostenko S.A. [The device for a thermostating of cells and embryos]. *Materialy 6 Mezhdunarodnoy konferentsii "Aktual'nye problemy biologii v zhivotnovodstve"* [Proc. 6th International conferences "Current Problems of Biology in Livestock Production"]. Borovsk, 2015, pp. 202–203. (In Russ.).
3. Goduchin O.V., Malachova V.I., Kalemenev S.V. [Dynamics of the functional condition of the worrying cut of a brain and the factors causing its violation]. *Uspechi fiziologicheskikh nauk* [Achievements of physiological sciences], 1992, vol. 23, no. 1, pp. 40–57. (In Russ.).

Contacts: *Shugailo Vladislav Vladimirovich*,
lab12ibp@bk.ru

Article received in edition: 7.07.2017