
МЕТОДИЧЕСКАЯ СТАТЬЯ

ПРОСТОЙ РЕГУЛЯТОР ПОДАЧИ CO₂ ДЛЯ ЛАБОРАТОРНОГО ИНКУБАТОРА
КЛЕТОК ИЗ ДОСТУПНЫХ КОМПОНЕНТОВ¹

© 2022 г. М. А. Суслов¹, Г. В. Сибгатуллина¹, Д. В. Самигуллин^{1, 2, *}

¹Казанский институт биохимии и биофизики Казанского научного центра РАН, Казань, Россия

²Казанский национальный исследовательский технический университет им. А.Н. Туполева,
Казань, Россия

*E-mail: samid75@mail.ru

Поступила в редакцию 10.10.2022 г.

После доработки 20.10.2022 г.

Принята к публикации 24.10.2022 г.

В настоящей работе описывается система автоматизации подачи CO₂ для лабораторного инкубатора клеток, которая позволит изготовить инкубатор с контролируемым уровнем CO₂ из доступного лабораторного оборудования. Регулятор CO₂ сконструирован в лабораторных условиях из простых компонентов с использованием аппаратно-программной платформы Arduino и может быть интегрирован в лабораторный термостат. В статье описаны результаты тестовых экспериментов на культурах клеток, которые демонстрируют работоспособность конструкции. Поскольку CO₂-инкубаторы являются важным и распространенным научным оборудованием, представленная в статье информация о нашей разработке будет полезна широкому кругу исследователей.

Ключевые слова: CO₂-инкубатор, регулятор концентрации CO₂, культуры клеток

DOI: 10.31857/S0869813922120135

ВВЕДЕНИЕ

Клеточные культуры в последние годы используются для множества различных научных и медицинских исследований. Культивирование стволовых клеток открывает широкие возможности для регенерации поврежденных тканей, восстановлению утраченных органов [1]. В научно-исследовательских целях культивирование клеток позволяет исследовать процессы онтогенеза и взаимодействие между клетками различных тканей [2, 3]. Культивирование различных линий раковых клеток позволяет увеличить эффективность поиска методов и подходов для борьбы с заболеванием раком, вести персонализированное лечение больных, проводить исследования новых лекарственных препаратов [4]. Также клеточные культуры позволяют исследовать взаимодействие наночастиц с клетками [5]. Клетки в культуре легко доступны для различных манипуляций и прижизненного наблюдения с помощью микроскопа. Для выращивания культур клеток используют биологические инкубаторы. Инкубаторы применяются в научных и медицинских лабораториях для культивирования бактерий и клеток различных тканей при контроле содержания углекислого газа, определенном значении температуры и при заданном уровне влажности в инкубаторе. Инкубаторы для бактериальных культур более простые и дешевые приборы и

¹ Дополнительная информация для этой статьи доступна по doi 10.31857/S0869813922120135 для авторизованных пользователей.

представляют собой простые термостатируемые шкафы. Существует множество конструкций подобных термостатов, и во многих лабораториях имеется подобное оборудование, которое широко применяется в лабораторной работе. Эти инкубаторы отлично подходят для выращивания и различных манипуляций с бактериями. Однако для работы с клетками млекопитающих (например, опухолевыми клетками человека, клетками мыши или крысы и т.д.), требуются инкубаторы, которые контролируют как температуру, так и содержание CO_2 в окружающем воздухе. Поддержание концентрации CO_2 на уровне 5% необходимо для поддержания рН обычных сред для культивирования клеток млекопитающих (например, ДМЕМ) [6]. Цена таких инкубаторов значительна. Задача данного исследования состояла в разработке простой системы контроля подачи CO_2 , которая позволила бы превратить обычный термостат в инкубатор с автоматическим контролем уровня этого газа. Есть несколько публикаций, описывающих сравнительно простые CO_2 -инкубаторы, но они описывают изготовление новых специализированных устройств [7–9]. Здесь мы предлагаем доработать уже имеющееся в лаборатории оборудование, что намного проще, дешевле и не займет много времени. Поскольку CO_2 -инкубаторы являются важным научным оборудованием, представленная в статье информация о нашей разработке будет полезна широкому кругу исследователей.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Разработанная система контроля концентрации CO_2 реализована на базе промышленного CO_2 -инкубатора ULAB модели UT-8050. В исходной комплектации в данной модели отсутствует датчик концентрации CO_2 , а система подачи газа регулируется по определенному алгоритму, исходя из временных промежутков, на которые открывалась дверь инкубатора, без контроля содержания концентрации CO_2 в газовой смеси во внутренней камере инкубатора. Несмотря на установленный уплотнитель на двери инкубатора, в течение суток происходила утечка CO_2 , которую не удавалось скомпенсировать. Это сказывалось на качестве роста клеточных культур. Было решено полностью заменить штатную систему подачи газа. Штатная система термостабилизации была оставлена без изменений, так как она неплохо справлялась со своей задачей.

Основные компоненты системы контроля подачи представлены на рис. 1.

Регулятор концентрации CO_2 в камере инкубатора

В качестве анализатора концентрации CO_2 был использован недисперсионный инфракрасный сенсор MH-Z16 с отдельным интерфейсным адаптером I2C/UART (Winsen, Китай). Ключевыми компонентами датчика являются инфракрасный источник (светодиод), измерительная камера или световая трубка, фильтр длины волны и инфракрасный детектор. Окружающий воздух естественным образом попадает в измерительную камеру, затем концентрация CO_2 в воздухе измеряется электрооптическим путем благодаря поглощению определенной длины волны в инфракрасном спектре. Интенсивность инфракрасного излучения, с которой луч от источника достигает детектора, обратно пропорциональна концентрации CO_2 в измерительной камере датчика. Молекулы других газов не поглощают свет на выбранной длине волны, так что они не могут повлиять на количество света, попадающего на детектор. Данный сенсор CO_2 был выбран исходя из следующих его преимуществ:

1) хорошая селективность и отсутствие зависимости от содержания кислорода, быстрое время отклика (<30 с), достаточно высокая точность (± 50 ppm и длительный срок службы (более 5 лет);

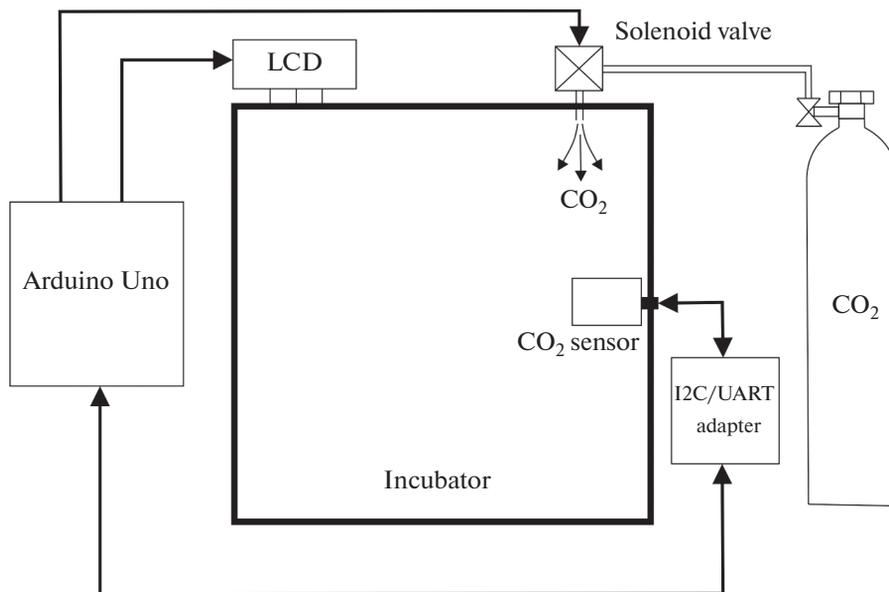


Рис. 1. Общая схема инкубатора с регулятором концентрации CO₂. Аппаратно-программная платформа (Arduino Uno), камера инкубатора (Incubator), жидкокристаллический дисплей (LCD), сенсор CO₂ (CO₂ sensor), адаптер сенсора CO₂ (I2C/UART adapter), электромагнитный клапан (solenoid valve), баллон CO₂ с редуктором.

2) в отличие от химических датчиков CO₂, этот датчик не нуждается в постоянно включенном нагревательном элементе и поэтому имеет низкое энергопотребление;

3) датчик имеет заводскую калибровку и настроен на необходимый диапазон концентраций CO₂ (0–10%), при этом в датчике предусмотрена легкая самостоятельная калибровка, которая осуществляется путем нажатия специальной кнопки на интерфейсном адаптере I2C/UART;

4) инфракрасный сенсор и адаптер I2C/UART изготовлены в виде отдельных блоков, что позволило разместить внутри камеры CO₂-инкубатора непосредственно сам инфракрасный сенсор, а остальную часть, включая соединительные провода, вынести наружу;

5) датчик имеет приемлемый для наших условий эксплуатации диапазон рабочих температур (0–50°C) и влажности (0–95%), а также устойчив к кратковременному повышению температуры в CO₂ инкубаторе до 100°C, необходимому для периодической стерилизации камеры.

Автоматизация контроля концентрации CO₂ в камере инкубатора была реализована на базе аппаратно-программной платформы Arduino Uno R3. Управление датчиком концентрации CO₂ MH-Z16 осуществляется с помощью последовательного интерфейса передачи данных (UART). Данные о концентрации CO₂ в камере инкубатора выводятся на ЖК-дисплей LCD 1602 по шине I2C. При снижении порогового значения концентрации CO₂ в камере, который задается программным путем, производится подача CO₂ из баллона по пневмомагистральной линии через электромагнитный клапан Burkert 6105 (Fluidcontrolsystems, Германия). Давление на входе электромагнитного клапана устанавливалось при помощи стандартного редуктора на баллоне и составляло 0.05 МПа. Открытие электромагнитного клапана произво-

дится путем подачи на него сигнала с цифрового порта Arduino, усиленного на биполярном транзисторе КТ829А.

Блок-схема автоматизации контроля концентрации CO_2 в камере инкубатора приведена на рис. 1. Программный код для автоматизации контроля концентрации углекислого газа в камере инкубатора представлен в Приложении.

Культура клеток

Для тестирования работы регулятора CO_2 были использованы первичные культуры мотонейронов крысы. Получение культур проводили по методу, описанному нами ранее [10]. Клетки высаживали на культуральные 6-луночные планшеты и выращивали до проведения эксперимента в течение 7 дней в среде ДМЕМ, содержащей феноловый красный.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Известно, что оптимальные показатели рН среды для выращивания культивируемых клеток составляют 7.2–7.4 [11]. Повышение или понижение уровня кислотности крайне нежелательно. Для нейтрализации избытка ионов водорода и поддержания оптимального уровня кислотности среды культивирования принято использовать буферную систему на основе бикарбоната натрия. Для поддержания правильного баланса в данной системе необходим CO_2 в концентрации 5–10%.

Бикарбонатная буферная система обеспечивает постоянный уровень рН равновесным соотношением между бикарбонатом натрия (NaHCO_3) в культуральной среде и CO_2 в инкубаторе, при этом она является недорогой и нетоксичной для клеток. В результате повышения концентрации CO_2 в газовой фазе увеличивается количество CO_2 , растворенного в питательной среде, что ведет к росту концентрации H_2CO_3 и понижению рН. Напротив, если концентрация CO_2 газовой фазы снижена, то рН повышается за счет обратной реакции [12, 13]



Для отслеживания изменений рН в процессе культивирования используют феноловый красный – кислотно-основный индикатор, добавляемый в питательные среды. При низком уровне рН феноловый красный приобретает желтую окраску, тогда как при высоких уровнях рН он имеет пурпурный цвет, ярко-красный цвет среды соответствует рН 7.4, оптимальному для культивирования клеток животных [11].

При работе с культивируемыми клетками снижение уровня CO_2 в инкубаторе связано не только с его расходом в ходе вышеупомянутой реакции при активации клеточного метаболизма, но и с его выходом из камеры при открывании дверцы инкубатора. По нашим данным, открытие дверцы на 30 с приводит к снижению содержания CO_2 с исходных 5% до $1.2 \pm 0.1\%$. При установленных настройках регулятора CO_2 восстановление базового уровня CO_2 происходит в среднем за 25 мин (рис. 2а). При дальнейшей работе без открывания дверцы инкубатора базовый уровень поддерживается длительное время (рис. 2б). Процесс восстановления концентрации CO_2 после открытия дверцы можно ускорить программным методом, увеличивая время открывания клапана. В нашем случае 25 мин являлось достаточным временем для установления стационарных условий и точности концентрации CO_2 .

Для проверки работоспособности регулятора CO_2 нами был проведен ряд контрольных экспериментов.

Инкубирование питательных сред в термостате в течение 12 ч при отключенном регуляторе CO_2 не вызывало изменения цвета индикатора (рис. 3а), тогда как при

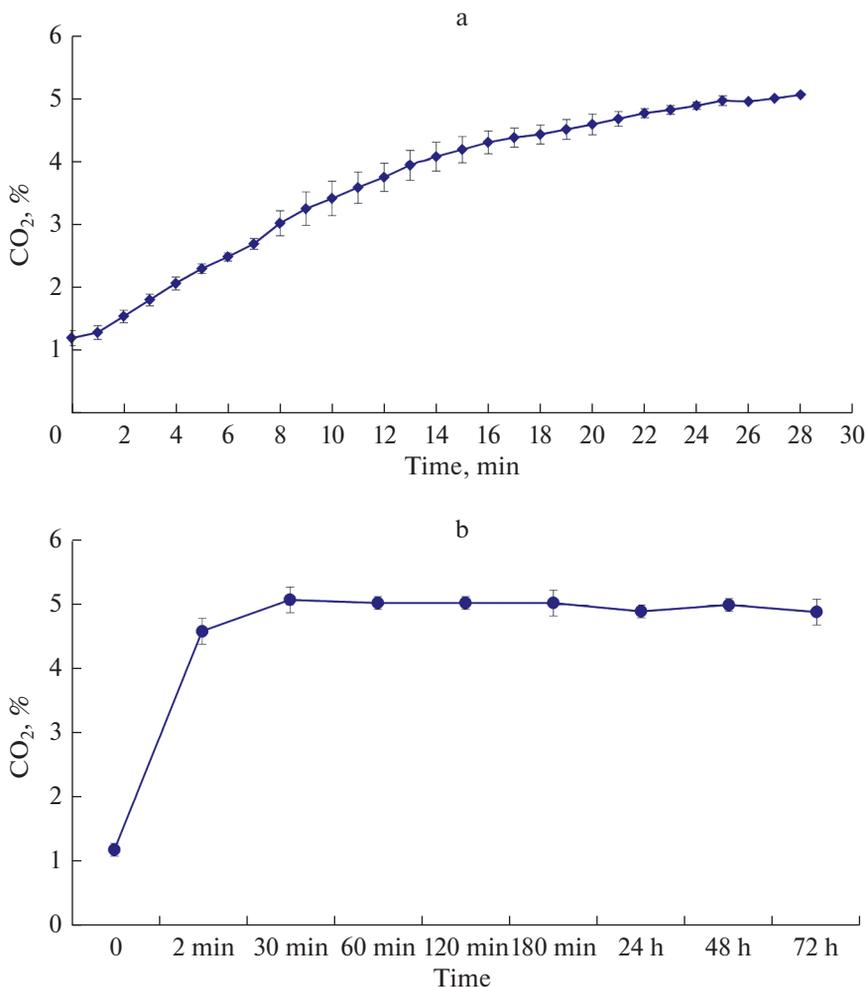


Рис. 2. Динамика содержания CO₂ в инкубаторе. (а) – после снижения содержания CO₂ при открывании дверцы инкубатора. (б) – в течение трех суток без открывания дверцы инкубатора.

подключенном регуляторе CO₂ наблюдали изменение окрашивания раствора с пурпурного до бледно-розового (рис. 3б). Анализ pH показал, что пурпурный цвет соответствовал значению 8.7, тогда как бледно-розовый – 7.0.

Далее эксперимент был повторен с первичной культурой мотонейронов. Инкубирование клеток в термостате в течение 12 ч при подключенном регуляторе CO₂ способствовало сохранению плотности и уровня жизнеспособности культуры (рис. 4а), тогда как отключение регулятора CO₂ приводило к гибели клеток и отрыванию их от субстрата (рис. 4б).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В настоящей работе мы предложили простую систему для автоматизации контроля концентрации CO₂, которую можно использовать для изготовления просто-

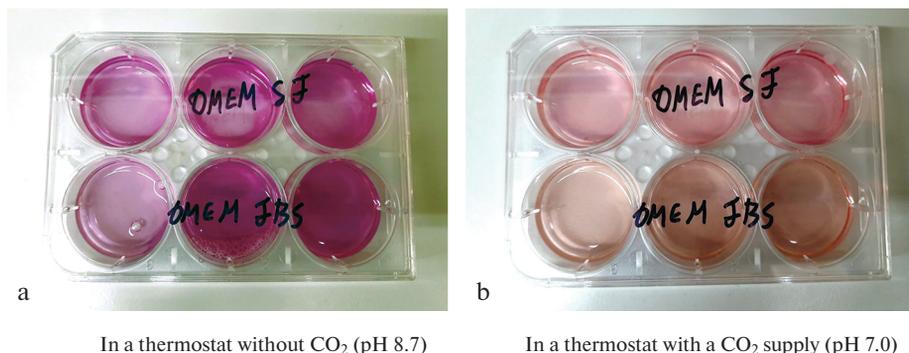


Рис. 3. Изменение цвета питательной среды, содержащей индикатор уровня pH, через 12 ч инкубации в термостате с выключенным (а) и включенным (б) регулятором CO₂.

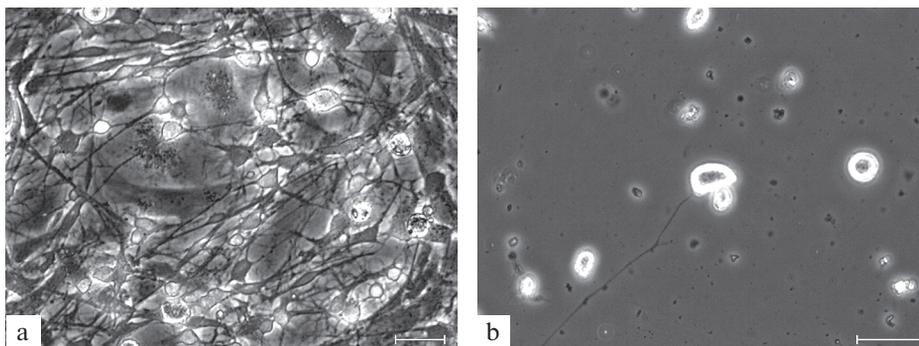


Рис. 4. Первичная культура мотонейронов крысы через 12 ч инкубации в термостате с включенным (а) и выключенным (б) регулятором CO₂. Размер шкалы – 20 мкм.

го и недорогого CO₂-инкубатора для выращивания клеточных культур. Регулятор концентрации CO₂ реализован на доступной платформе Arduino, легко настраивается и может использоваться в лабораторной практике в учебных заведениях и исследовательских лабораториях. В отличие от уже описанных устройств, наш инкубатор отличается более простой и гибкой конструкцией за счет того, что мы предлагаем усовершенствование уже имеющегося в лаборатории оборудования [7–9]. Стоит отметить, что для стабильной работы инкубатора клеток необходимо обеспечить равномерный нагрев и распределение газа по всему объему камеры. Это обеспечивается наличием вентилятора, им обычно оборудуются стандартные термостаты. При этом необходимо следить за герметичностью камеры инкубатора. Обычно термостаты имеют стеклянную дверь с уплотнителем. Наличие утечек газовой смеси будет компенсироваться автоматически, но повлияет на расход CO₂. Если необходимо поддерживать определенную влажность в камере инкубатора, можно использовать естественное испарение. Для этого расположить на нижней полке камеры открытую емкость с водой и, изменяя площадь испарения, регулировать влажность. Мы протестировали собранный CO₂-инкубатор и продемонстрировали эффективность его работы на примере выращивания первичной куль-

туры мотонейронов. При помощи разработанного регулятора возможно поддерживать необходимую концентрацию CO₂ в инкубаторе в автоматическом режиме в течение длительного времени. Система позволяет регулировать подачу газа за счет перепрограммирования контроллера и адаптировать ее для различных экспериментальных задач. Например, процесс восстановления концентрации CO₂ после открытия дверцы можно ускорить программным методом, увеличивая время открывания клапана. Было показано, что в инкубаторе с 5% CO₂ первичная культура мотонейронов нормально развивается, в то время как та же культура не продемонстрировала рост в обычном инкубаторе без регулятора содержания CO₂. Таким образом, предлагаемый нами подход позволяет изготовить недорогой CO₂-инкубатор для выращивания клеточных культур и существенно сэкономить бюджет исследований.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 22-25-00731, <https://rscf.ru/project/22-25-00731/>.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией данной статьи.

ВКЛАД АВТОРОВ

Идея работы и планирование экспериментов (Д.В.С.), проведение экспериментальной работы и обработка данных (М.А.С., Г.В.С.), написание и редактирование манускрипта (М.А.С., Г.В.С. и Д.В.С.).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Чепелева Е, Павлова С, Малахова А, Покушалов Е, Закиян С (2016) Получение культуры клеток из скелетной мускулатуры крысы для применения в клеточной терапии ишемических поражений сердца. Патол кровообращ и кардиохир 19: 28–32. [Chepeleva E, Pavlova S, Malahova A, Pokushalov E, Zakijan S (2016) Obtaining cell culture from rat skeletal muscles for use in cell therapy of ischemic heart lesions. Patol Kровоobrash Kardiohir 19: 28–32. (In Russ)]. <https://doi.org/10.21688/1681-3472-2015-4-2-28-32>
2. Sibgatullina GV, Malomouzh AI (2020) GABA in developing rat skeletal muscle and motor neurons. Protoplasma 257 (3): 1009–1015. <https://doi.org/10.1007/s00709-020-01485-1>
3. Das M, Rumsey JW, Bhargava N, Stancescu M, Hickman JJ (2010) A defined long-term in vitro tissue engineered model of neuromuscular junctions. Biomaterials 31: 4880–4888. <https://doi.org/10.1016/J.BIOMATERIALS.2010.02.055>
4. Мингалеева РН, Соловьева ВВ, Блафф НЛ, Ризванов АА (2013) Применение культур клеток и тканей для скрининга противоопухолевых препаратов *in vitro*. Клеточн трансплантол и тканев инженерия VIII: 20–28. [Mingaleeva RN, Solov'eva VV, Blatt NL, Rizvanov AA (2013) The use of cell and tissue cultures for screening of antitumor drugs *in vitro*. Kletochn transplantol i tkanev inzhenerija VIII: 20–28. (In Russ)].
5. Fedorenko S, Stepanov A, Sibgatullina G, Samigullin D, Mukhitov A, Petrov K, Mendes R, Rümeli M, Giebeler L, Weise B, Gemming T, Nizameev I, Kholin K, Mustafina A (2019) Fluorescent magnetic nanoparticles for modulating the level of intracellular Ca²⁺ in motoneurons. Nanoscale 11: 16103–16113. <https://doi.org/10.1039/C9NR05071J>
6. McLimans WF (1972) The gaseous environment of the mammalian cell in culture. In: Growth, Nutrition, and Metabolism of Cells in Culture. Elsevier 137–170.
7. DIY CO₂ Incubator Bioreactor for Mammalian Cell Culture. <https://www.pellinglab.net/post/diy-incubator> Accessed 13 Sep 2022
8. Tayebi-Khorami M, Chegeni N, Birgani MT, Danyaei A, Fardid R, Zafari J (2022) Construction a CO₂ Incubator for Cell Culture with Capability of Transmitting Microwave Radiation. J Med

- Signals and Sensors 12: 127–132.
https://doi.org/10.4103/jmss.jmss_113_21
9. Arumugam A, Markham C, Aykar SS, Van Der Pol B, Dixon P, Wu M, Wong S (2021) PrintrLab incubator: A portable and low-cost CO₂ incubator based on an open-source 3D printer architecture. *PLoS One* 16: e0251812.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0251812>
 10. Sibgatullina GV, Malomouzh AI (2020) GABA in developing rat skeletal muscle and motor neurons. *Protoplasma* 257: 1009–1015.
<https://doi.org/10.1007/s00709-020-01485-1>
 11. Pörtner R (2009) Characteristics of Mammalian Cells and Requirements for Cultivation BT-Cell and Tissue Reaction Engineering: With a Contribution by Martin Fussenegger and Wilfried Weber. In: Eibl R, Eibl D, Pörtner R, Catapano G, Czermak P (eds). Springer Berlin Heidelberg. 13–53.
 12. Eisenblätter T, Psathaki K, Nitz T, Galla H-J, Wegener J (2002) Cell culture media: selection and standardization. In: Claus-Michael Lehr (ed) *Cell Culture Models of Biological Barriers*. CRC Press. London. 46–66.
 13. Фрешни РЯ (2017) Культура животных клеток. 5th ed. БИНОМ. Лаборатория знаний. М. [*Freshni RJa* (2017) *Animal Cell Culture*. 5th ed. BINOM. Laboratory of Knowledge. M. (In Russ)].

Simple CO₂ Regulator for Laboratory Cell Incubator from Available Components

M. A. Suslov^a, G. V. Sibgatullina^a, and D. V. Samigullin^{a, b, *}

^a*Kazan Institute of Biochemistry and Biophysics, FRC Kazan Scientific Center, Russian Academy of Sciences, Kazan, Russia*

^b*Kazan National Research Technical University named after A.N. Tupolev – KAI, Kazan, Russia*

**e-mail: samid75@mail.ru*

In this paper, we describe a CO₂ automation system for a laboratory cell incubator that will allow the production of a controlled CO₂ incubator from available laboratory equipment. The CO₂ controller is laboratory-built from simple components using the Arduino hardware/software platform and can be integrated into a laboratory thermostat. The article describes the results of test experiments on cell cultures, which demonstrate the performance of the design. Since CO₂ incubators are important and widespread scientific equipment, the information about our development presented in the article will be useful for a wide range of researchers.

Keywords: CO₂-incubator, CO₂ concentration controller, cell culture