

Pécsi Tudományegyetem
Műszaki és Informatikai Kar
Környezetmérnök Tanszék

Speciális in vitro mérőedény kalibrációjának vizsgálata

Készítette:	Berner Enikő Anna
Évfolyam:	4.
Belső konzulens:	Dr. Pécz Tibor
Beosztása:	tudományos főmunkatárs
Külső konzulens:	Dr. Vizvári Zoltán
Beosztása:	egyetemi adjunktus (Óbudai Egyetem)

2025.

Tartalomjegyzék

1	Előszó.....	1
2	Bevezetés	2
2.1	Az „in vitro” kísérletek	2
2.2	A BIS mérések ismertetése	2
2.3	Saját fejlesztésű eljárás	5
2.4	Célkitűzés, elvégzett munka	6
2.5	Elméleti, fizikai-kémiai alapok.....	7
3	Anyagok és módszertan	10
3.1	Négyelektrodás mérőlap	10
3.2	BIS mérési módszer	12
3.3	Fiziológiás sóoldatos mérések	18
3.3.1	A vezetőképesség mérés elve.....	20
3.3.2	Konduktometriás kalibráció.....	Hiba! A könyvjelző nem létezik.
3.4	Bemérés	21
4	Eredmények ismertetése	25
4.1	Diszkusszió	33
5	Konklúzió.....	40
5.1	Kalibrálációs utasítás	Hiba! A könyvjelző nem létezik.
6	Irodalomjegyzék	41
7	Ábrajegyzék	45

1 Előszó

2022-ben ismerkedtem meg a Multidiszciplináris Orvosi és Mérnöki Celluláris Bioimpedancia Kutatócsoporttal egy ösztöndíj lehetőség keretein belül. A tevékenységük igencsak megtetszett, mivel olyan témával foglalkoztak, ami ötvözi a mérnöki területet a biológiával, ezt továbbtanulás esetén is tudnám vizsgálni, így csatlakoztam hozzájuk.

Eleinte kisebb, egyszerűbb feladatokat csináltam, majd segíthettem sejtes méréseknél, ami különösen megtetszett. A kutatócsoport tagjaként részt vehettem egy foglalkozáson, ahol több napon keresztül életben tartottunk egy sejt kultúrát, annak vizsgáltuk a különböző tulajdonságait.

Bár a sejtes kísérletek világa rendkívül érdekes számomra, szerettem volna a vizsgált témát mérnöki megközelítésben elemezni ebben a dolgozatban, ahogy azt a szakdolgozatomban is tettem.

A munkámat többen is segítették, itt szeretném megragadni az alkalmat, hogy köszönetet nyilvánítsak. Először is szeretném megköszönni Győrfi Ninának, a kutatócsoport oszlopos tagjának, aki segített tájékozódni a laboron belül, az egyes részfolyamatok megvalósításánál. Másodszorban Pataki Tamásnak és Varga Zsoltnak, tanszéki mérnököknek, akik a vezetőképeségmérést felügyelték, segítettek a lebonyolításban; belső konzulensemnek, Dr. Pécz Tibornak, aki segített, hogy a szakdolgozatom gördülékenyen elkészíthessem. És végül, de nem utolsósorban Dr. Vizvári Zoltánnak, külső konzulensemnek és oktatómnak, aki bemutatta nekem a kutatócsoportot, és rengeteget segített a dolgozatom készítése során.

2 Bevezetés

2.1 Az „in vitro” kísérletek

„Az „in vitro” egy latin eredetű kifejezés, aminek szó szerinti jelentése „üvegben”. Azt a tudományos kísérleti technikát jelenti, amikor a vizsgálat nem egy élő szervezetben, hanem azon kívül, például egy kémcsőben, tenyészedényben vagy valamilyen más laboratóriumi berendezésben zajlik le.” [1] Ezen vizsgálatok során sejtvonalakat használnak az élettani és a kóros folyamatok, illetve a toxikológiai hatásmechanizmusok vizsgálatára. Az IVF (in vitro fertilizáció) az egyik legismertebb alkalmazása ennek a technikának, ami során a szervezeten kívül, mesterségesen történik meg a petesejt megtermékenyítése laboratóriumi körülmények között, majd az így keletkezett zigótát visszaültetik az anyaszervezetbe [2].

Az in vitro kísérletekből kinyerhető információk mennyiségét növelni képes technológiák fejlesztése a kapcsolódó kutatások középpontjában áll évtizedek óta [3] [4]. Néhány tulajdonság könnyen kimutatható (például életképesség, sejtszám, morfológia), azonban a legtöbbhöz reagens szükséges, ami több paraméter egyidejű mérését korlátozza, mivel általában az alkalmazott festékek specifikusak egy vizsgált tulajdonságra és toxikusak a sejtekre, ezért ugyanazon tenyészetet többször nem lehet elemezni hagyományosan. Ahhoz, hogy a lejátszódó folyamatokat megfigyeljük, egy olyan módszert kellett kifejleszteni, ami képes a sejtek tulajdonságait valós időben, roncsolás- és jelölésmentesen követni. Az in vitro bioimpedancia (BI) vizsgálat ígéretes módszer, és valódi megoldást jelenthet az említett problémák megoldására [5] [6] [7].

2.2 A BIS mérések ismertetése

A bioimpedancia a biológiai szövetek elektromos tulajdonságait jellemző kifejezés, amely akkor lép fel, ha a vizsgált biológiai struktúrán áram folyik keresztül. Az impedancia függ a frekvenciától, a vizsgált mintától (szövettypustól, felépítéstől). Két alapvető tulajdonsága az ellenállás és a kapacitás. Az ellenállás (R) megmutatja, hogy egy anyag mennyire áll ellen az elektronok áramlásának, vagy egy vizes oldatban (és élő rendszerekben) az ionok áramlásának. A kapacitás (C) kifejezi, hogy a rendszer milyen mértékben képes tárolni a rávezetett energiát [8].

A BI mérések elődjének tekinthető az elektromos ellenállásmérés, melynek úttörőjei hozták létre a geofizikai mérésekben mai napig használt négyvezetékes

elektromos ellenállásmérést (VESZ és HESZ) [9]. Ezekben az esetekben egyenáramú gerjesztést alkalmaznak, míg az itt tárgyalt módszernél váltakozó áramút. Ez nehézségeket okoz a műszerhasználat és a modellezés során, mivel olyan elektrokémiai jelenségek képnek fel, amik az egyenáramú méréseknél nem jelentkeznek [10].

A bioimpedancia spektroszkópia (BIS) az 1980-as évek óta széleskörben elterjedt technika [11], melyet előszeretettel használnak az emberi test összetételének mérésére, a víztartalom meghatározására [12] [13] [14] [15], illetve a daganatos sejtek megkülönböztetésére [16]. Ellenben a teljes testösszetétel mérések sikerével, az in vitro kísérletek terén a technika kevésbé elterjedt. Ennek oka valószínűsíthetően a mérőműszer alapvető elrendezése lehet [11] [17]: az általánosan használt BIS rendszerek kételektródás elrendezést alkalmaznak a biológiai minták vizsgálatára, amíg ez az elrendezés kiváló egyes tulajdonságok mérésére, nagymértékben csökkenti a kapott eredmények specifikusságát a fellépő kontakt impedancia miatt [18]. In vitro bioimpedancia spektrum műszerek emberi és állati sejttenyészet, baktériumok vagy akár vírusok vizsgálatára alkalmasak, különböző élettani folyamatok követésére, mint például a májzsírosodás, vagy mikroműanyagok hatásmechanizmusa.

A bioimpedancia spektrum mérés biztosította ígéretes lehetőségek ellenére számos kihívás és még nyitott kutatási terület vár vizsgálatra. Habár, a BIS technikák közismertek, szükséges fejleszteni a módszer érzékenységét és specifikusságát, illetve ki kell alakítani a bizalmat a felhasználókban a technika alkalmazása esetén [19].

A legismertebb és leggyakrabban alkalmazott bioimpedancia alapú jelölésmentes in vitro módszer az elektromos cella-szubsztrát impedancia (ECIS) mérés: a sejtek közvetlenül a tenyészedény alján elhelyezkedő koplanáris (egy síkra illeszkedő) elektróda felületén növekednek [19]. Az elektróda anyag kulcsfontosságú, mivel a kételektródás elrendezésben a sejtek kapcsolódnak az elektródához, így jön létre a sejt-elektrolit-elektroda határfelület [20], ebből következik, hogy kizárólag biokompatibilis, nem toxikus anyagok használhatóak elektródaaként (például arany, platina, titán vagy szerves anyagok, mint polisztirol-szulfonát, polianilin és grafén-oxid) [21]. Az utóbbi években a grafén előtérbe került, mint potenciális elektródaanyag, számos előnye miatt: rugalmas (akár kézzel is felvihető az elektródákra) és előnyösen viselkedik többfrekvenciás méréseknél [21] [22]. A kételektródás elrendezésnél elektromos kettősréteg alakul ki, ami korlátozza az alkalmazható frekvenciatartományt alacsony frekvencián (100 Hz alatt)

[21], sok esetben a grafén alapú módszerekkel tágítható az alkalmazott tartomány [21] [22].

Az in vitro BIS mérések alappillére - többek között - a reprodukálhatóság. Az ismételt mérések közötti különbségek jellemzőinek vizsgálata biológiai és mérés technikai szempontból is fontos, illetve befolyásolja a kapott eredményeket is. A szakirodalom általánosságban pozitívan vélekedik a bioimpedancia spektrum mérések ismételhetőségéről, különösen a testösszetétel mérések esetén [23] [24] [25], in vitro kísérletek alkalmazásakor elégségesnek tartják [6] [26]. Összevetve a BIS módszereket, az ECIS tekinthető a legfejlettebbnek és legkifinomultabbnak. A módszer számos kutató érdeklődését felkeltette a széleskörű alkalmazhatósága miatt, beleértve a reprodukálhatóságot [5] [27].

2.3 Saját fejlesztésű eljárás

A kutatócsoport (melynek jómagam is tagja vagyok) által fejlesztett rendszer esetében kiemelkedően javult a mérések jel-zaj (SNR) aránya az alacsonyabb frekvenciatartományban, és a teljes mért tartományban kiküszöbölhető lett a zajhatás [28] [29] [30] [31], így jelentősen növekedett a mérések megismételhetősége és pontossága. A technika a szabványos négyelektródás módszeren alapul [32], amivel kizárható a mérési impedancia az elektródfelület és a vizsgált anyag között [28]. Emiatt a kutatócsoportunk bizonyította a BIS technika kiemelkedő tulajdonságait, és sikeresen validált egy digitális lock-in erősítő prototípust, amit a technológia megvalósításához hozott létre. A fejlesztett módszer pontosságáról készült publikációban bemutattuk az ultraprecíziós ellenállásokból létrehozott speciális áramköröket, amik képesek voltak a hőmérsékleti együttható értékével megegyező (kevesebb, mint 2 ppm/°C) szórású impedanciaértékek kimutatására [29]. Azt tapasztaltuk, hogy a szórás néhány esetben még a hőmérsékleti együtthatónál is kisebb volt (<2 ppm), míg a hagyományos mérési módszer lényegesen nagyobb (5-33 ppm) volt. Ezek az eredmények igazolták, hogy a saját fejlesztésű technika és a prototípus alkalmas az in vitro BIS mérések elvégzésére, variabilitását a mérési elrendezés és a közvetett biológiai folyamatok generálják, nem pedig a technológiai háttér [33].

Az in vitro mérések saját fejlesztésű BIS-mérési módszere lehetővé teszi a speciális anyagminőségi jellemzők mérését a frekvenciatartományban. Ehhez olyan mérőlemezeket kellett létrehozni, amelyek alkalmazkodnak a speciális négyelektródás technológia előnyös tulajdonságaihoz, miközben minimalizálják a további hibák lehetőségét. Az élősejtes mérőlemezek alapját a kutatócsoport által fejlesztett BIS mérőlemezek képezik [31]. Ebben az esetben a kutatócsoportunk elsődleges célja volt, hogy minimalizáljuk az elektród-cella, elektród-elektrolit átmenet okozta hatásokat, amely a gerjesztő és földelő elektródákból származik (amelyeken az ECIS technológia alapul). A gerjesztő elektródák felületét minimalizáltuk és kizártuk az adatrögzítésből, az érzékelő elektródák felületét maximalizáltuk a lehető legnagyobb érzékenység elérése érdekében [33]. A mérőberendezés bemenetei ezüsthuzalok segítségével csatlakoznak a lemezekhez, a sejtkultúrákat pedig két előkészített sejtkultúra-csészében (Petri-csészében) tenyésztjük a lemezekre, amelyek a mérésekhez igazított elektróda elrendezések alapján készültek el [33]. A kézzel készített mérőlemezek tehát az in vitro BIS technológiák egy teljesen új válfaját jelentik.

2.4 Célkitűzés, elvégzett munka

A munkám során végzett tevékenységeim és a megfogalmazott céljaim:

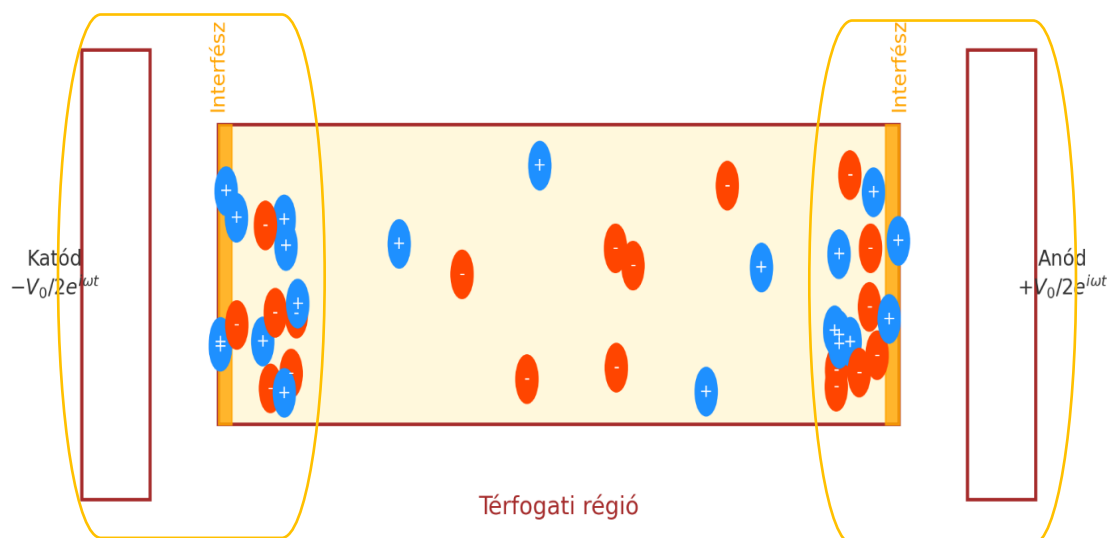
- Mérőlapok gyártási mechanizmusának, kézi sorozatgyárthatóság elsajátítása,
- Fiziológiai sóoldatos validálás elsajátítása,
- Mérések elvégzése maximálisan reprodukálható módon,
- Annak vizsgálata, hogy a konduktometriás kalibrálási módszertan miként adaptálható a saját fejlesztésű technika esetében (mivel a BIS mérések eredményei nincsenek kalibrálva, ezért azok nem összehasonlíthatóak más eszközökkel mért vezetőképesség értékekkel),
- Javaslattétel kalibrálási metodika bevezetésére.

Céljaim eléréséhez először megismerkedtem a kutatócsoport eddigi, számomra releváns publikációival, illetve a tudomány jelenlegi állását tükröző BIS méréseket bemutató, leíró irodalmakkal. Megnéztem, hogy a rendelkezésre álló fizikai modellek miként képesek segíteni a céljaim elérését, a probléma kezeléséhez legközelebb álló elméleti alapokat felkutattam. Ezután elkészítettem a vizsgálathoz szükséges mérőlapokat: 5 plate sorozatot készítettem, amelyek egyenként 5 mérőlapot tartalmaznak, tehát a kutatási munkám során összesen 25 darabot vizsgáltam. A validálásukhoz fiziológiás sóoldatsorozatokot készítettem 5 különböző sókoncentrációval (0%, 25%, 50%, 75%, 100%), mindegyik plate sorozathoz 1 sóoldatsorozat, vagyis 5 oldat tartozik, összességében 25 különböző oldatot kevertem. Az oldatoknak megmértem a vezetőképességét konduktométer segítségével, mindegyik oldatnál 5-ször ismételttem meg, így összesen 125 konduktometriás vizsgálatot végeztem el. Az oldatokat ezután a plate-ek beméréséhez használtam: a méréseknél növekvő sókoncentrációt alkalmaztam, a megfelelő mennyiség kimérése után elindítottam a műszeres mérést, minden egyes oldattal 5 mérést végeztem, így összesen 625 mérési fájl keletkezett. Ezeket táblázatkezelő szoftver segítségével kiértékelem, majd újabb táblázatokat létrehozva egyenként, frekvenciánként, majd az összes mérési eredményt egyben vizsgáltam, összehasonlítottam, diagramokat állítottam elő az adatokból.

A mérőlapok kalibrációja további információkat biztosíthat a mérésekről, tovább pontosíthatja a kapott eredményeket. A kalibrációs görbéből visszaigazolást nyerhetünk a rendelkezésre álló elméleti alapok alkalmazhatóságáról az esetünkben.

2.5 Elméleti, fizikai-kémiai alapok

A BIS mérések fizikai-kémiai alapjainak megértéséhez szükségesnek látom bemutatni a tudomány jelenlegi állását tükröző matematika-fizikai ismereteket. Az elektrolitikus cellák impedancia-válasza különféle információkat szolgáltat, lehetővé téve a komplex diffúziós folyamatok megértését, mint például a folyadék-szilárd határfelületen lejátszódó jelenségeket, amelyek kulcsfontosságúak számos technológiai alkalmazás, valamint az életet fenntartó folyamatok megismerése szempontjából. Az impedancia spektroszkópia folyadékok elektromos tulajdonságainak jellemzésére is használható módszer, amelyek összefüggésbe hozhatók a vizsgált anyag fizikai paramétereivel. A vizsgálandó anyagot egy téglalap alakú kondenzátorba töltve tudjuk elemezni, ahol az elektródák (anód és katód, lila téglalappal jelölve) a térfogati régió két oldalán helyezkednek el, ennek megfelelően az ionok (kék és piros jelzéssel) a kondenzátorban az ellentétes töltésű elektróda irányába vándorolnak, azoknak a környezetében halmozódnak fel. (2.1. ábra)



2.1. ábra: Elektrolitikus cella vázlata

A diffúziós egyenletekkel kapcsolatos felületi folyamatok modellezésére peremfeltételeket alkalmaznak. A modell (melyet E.K. Lenzi és munkatársai dolgoztak ki) monovalens, egyszeres töltésű ionokat tartalmazó oldatot feltételez, amiben az anionok és kationok disszociációja egyforma mértékű, teljes disszociáció ($D^+ = D^- = D$). A modell egy téglalap alakú cellát vizsgál, melyben az elektródák (katód és anód) „d”

távolságra helyezkednek el egymástól, ezek ún. „blocking” elektródák, ami azt jelenti, hogy nem lépnek reakcióba, rajtuk nincs anyagáram, ezért a felületükön akkumulálódnak a töltések. A cellára jellemző az anyagmegmaradás és a töltésmegmaradás, az elektromos mező forrása az ionok koncentrációkülönbsége [34].

A kondenzátort váltakozó feszültség alá helyezve mérhető a minta impedanciája, (Z) az alkalmazott frekvencia függvényében. A vizsgálat kis amplitúdón történik, így a minta válaszjele külső jelre lineáris jellegű. A cella impedanciája a következő képlettel írható fel [35]:

$$Z = -i \frac{2}{(\omega \varepsilon \beta^2 S)} \left\{ \frac{1}{\lambda_0^2 \beta} \tanh\left(\beta \frac{d}{2}\right) + i \frac{\omega d}{2D} \right\} \quad (2.1)$$

ahol

- Z a mért impedancia érték,
- $i = \sqrt{-1}$ az imaginárius egység,
- ω a gerjesztés során alkalmazott körfrekvencia,
- ε az oldószer dielektromos állandója,
- S az elektróda felület,
- d az elektródatávolság,
- D a diffúziós együttható,
- λ_0 a Debye-hossz, ami teljesen disszociált monovalens ionokból álló oldat esetében a következőképpen számítható:

$$\lambda_0 = \sqrt{\frac{\varepsilon k_B T}{2Nq^2}} \quad (2.2)$$

- k_B a Boltzmann állandó,
- T az abszolút hőmérséklet,
- N az oldat koncentrációja,
- q az ionok valenciája (töltése),

A (2.1) egyenlet, mivel egy komplex függvényt ír le, ezért felírható a következő alakban [35]:

$$Z = \sigma_z + i \omega \varepsilon_z = \frac{1}{R} \frac{d}{S} + i \left(-\frac{1}{\omega \chi S} \frac{d}{S} \right) = \frac{d}{S} \cdot \left[\frac{1}{R} + i \left(-\frac{1}{\omega \chi} \right) \right] \quad (2.3)$$

A (2.3) képletből R (ellenállás) és X (kapacitás) tagok mérhetőek, amiből σ_z (fajlagos vezetőképesség) és ε_z (dielektromos állandó) anyagjellemzők kiszámolhatók, hiszen

$$\sigma_z = \frac{1}{R} \frac{d}{S} \quad (2.4)$$

és

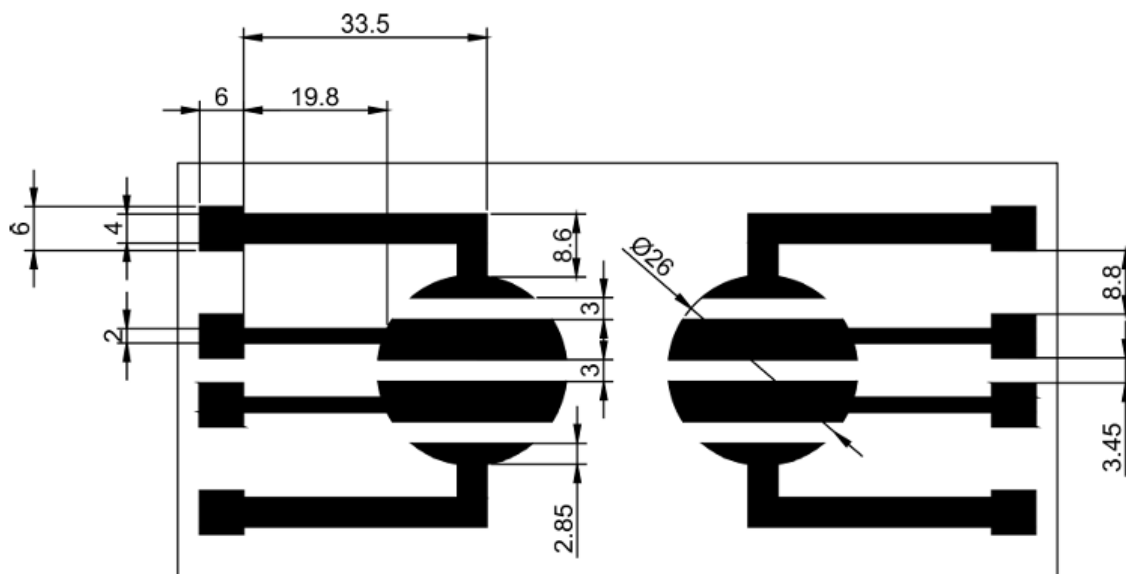
$$\varepsilon_z = -\frac{1}{\omega X} \frac{d}{S} \quad (2.5).$$

A (2.3), (2.4), (2.5) képletekből jól látszik, hogy a (2.1) egyenlettel definiált, és a 2.1. ábrán szemléltetett modell esetében lineáris kalibrálás alkalmazható, és hogy a $\frac{d}{S}$ arány ismeretében kiszámíthatók a σ_z (fajlagos vezetőképesség) és ε_z (dielektromos állandó) értékek, a mérési adatok függvényében. A kalibrálás során az ismert R , σ_z és X , ε_z értékpárok segítségével kiszámítható a lineáris kalibrációs tényező, ami most itt éppen $\frac{d}{S}$ hányadossal egyenlő. A továbbiakban, főleg a vizsgálatokhoz használt, bonyolult geometria esetében ettől a feltételezéstől eltekintek, és kizárólag az R , σ_z és X , ε_z értékpárok összefüggésére koncentrálok.

3 Anyagok és módszertan

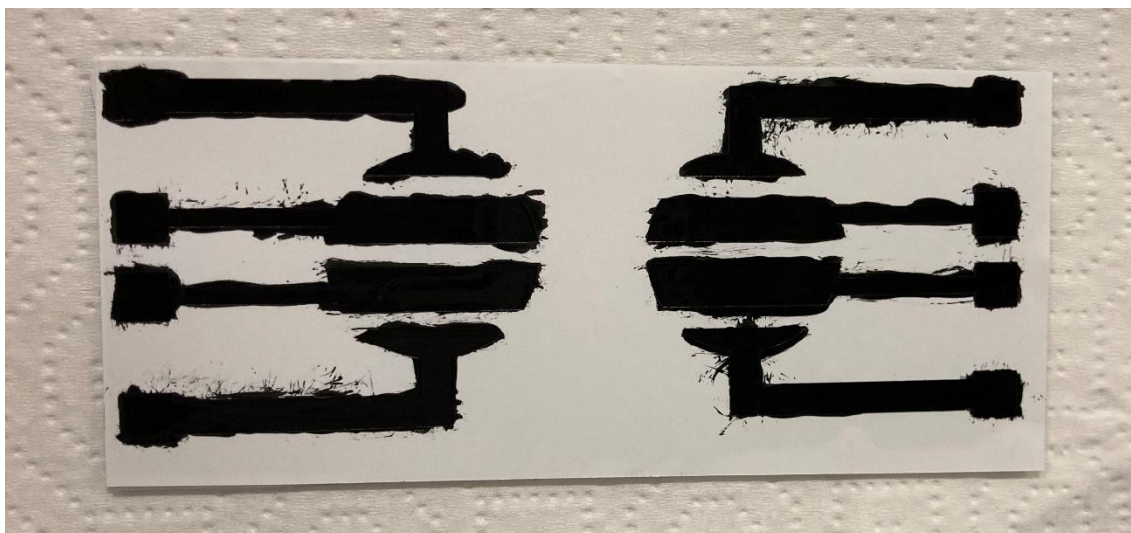
3.1 Négyelektrodás mérőlap

A kutatócsoport az in vitro vizsgálatokhoz fejlesztett négyelektrodás BIS mérési módszert alkalmazza. A mérésekhez saját tervezésű mérőlapokat gyártunk, melynek tervrajza a 3.1. ábrán látható. A tervrajzon olyan mérőlap látható, amelyre kettő Petri-csésze helyezhető a kör alakú területre.

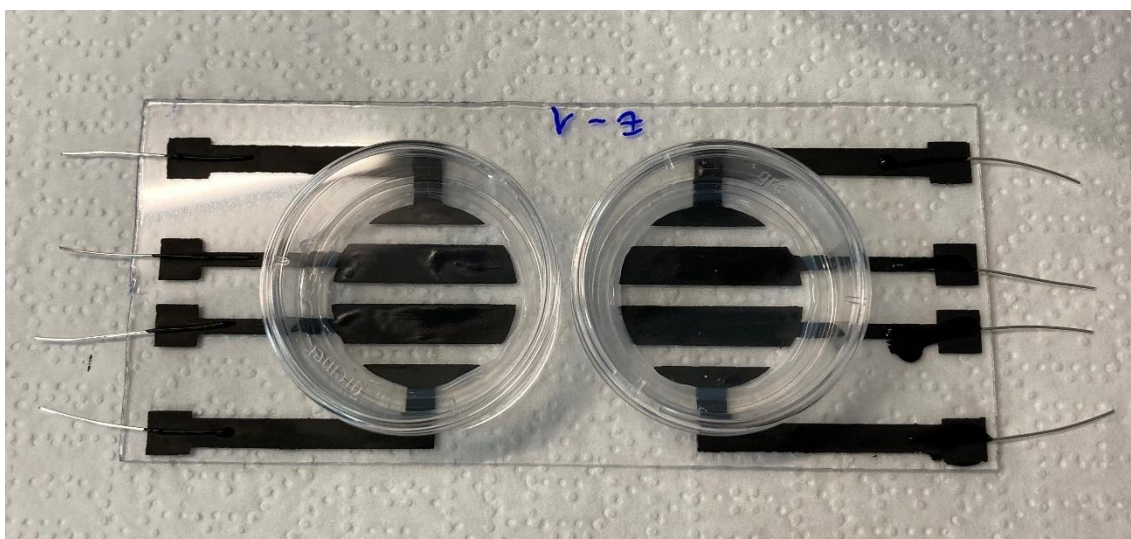


3.1. ábra: A grafénalapú BIS-lemez tervrajza (a méretek milliméterben megadva)
[33]

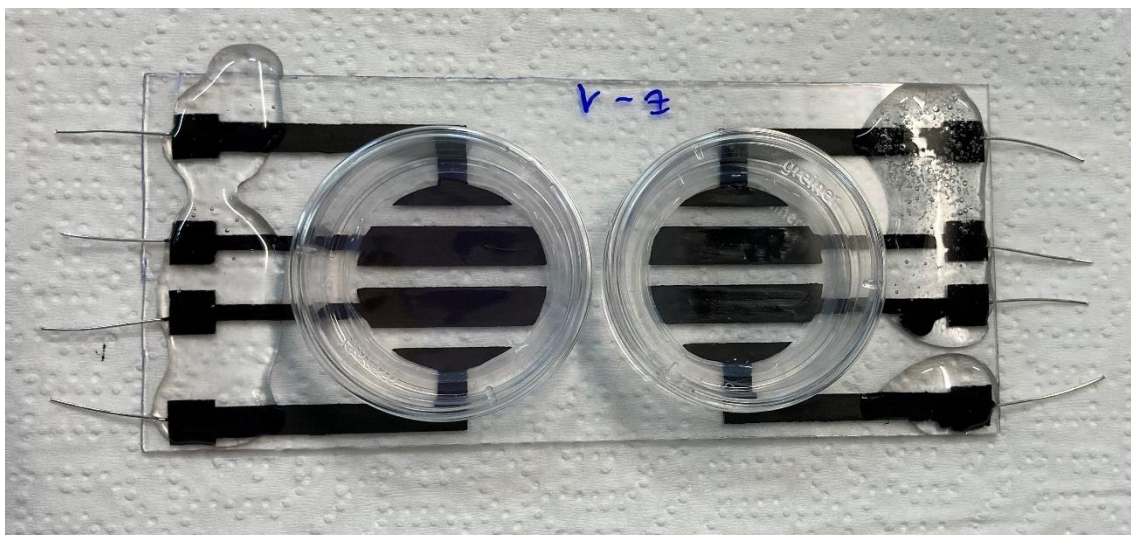
A mérőeszközök alapját 0,5 mm vastag, 115*48 mm nagyságúra szabott, átlátszó polikarbonát lap (Lexan Clear Polycarbonate 500 mikron vastagságú lemez) képezi. Elektrodaként grafént alkalmazunk (mivel mérési és biológiai szempontból hatékonyabb, mint az arany), a grafén pasztát (SunChemical C2171023D1 Carbon Graphene Paste) butilacetáttal 1:1 arányban hígítva, ecsettel visszük fel a felületre, 2-3 rétegben, hogy a megfelelő fedést elérjük. A szabályos mintázat felfestéséhez stencilt használunk (lásd 3.2. ábra). Ezután körülbelül 5 cm hosszúságú (0,5 mm vastagságú, 99% tisztaságú) ezüstsálakat vágunk, grafénnel bevonjuk az érintkezési felületeit (lásd 3.3. ábra), majd kétkomponensű epoxigyanta ragasztóval tartósan rögzítjük őket a 4-4 elektródavégre (lásd 3.4. ábra). A polikarbonát lapokra alul nyitott, 35 mm átmérőjű Petri-csészéket helyezünk, amiket nem-toxikus szilikonragasztóval rögzítünk a lemezre, illetve ezzel a ragasztóval az ezüstsálakat rögzítő epoxiragasztót is bevonjuk (lásd 3.5. ábra).



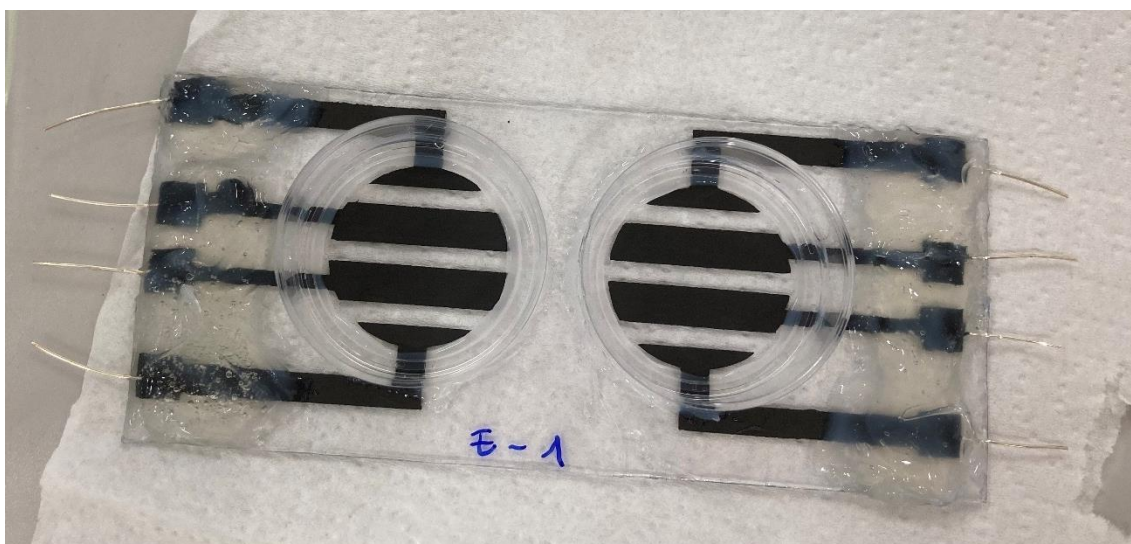
3.2. ábra: Grafén felvitele stencil használatával



3.3. ábra: Ezüsthuzal és Petri-csésze rögzítése



3.4. ábra: Ezüsthuzal rögzítése epoxi ragasztóval



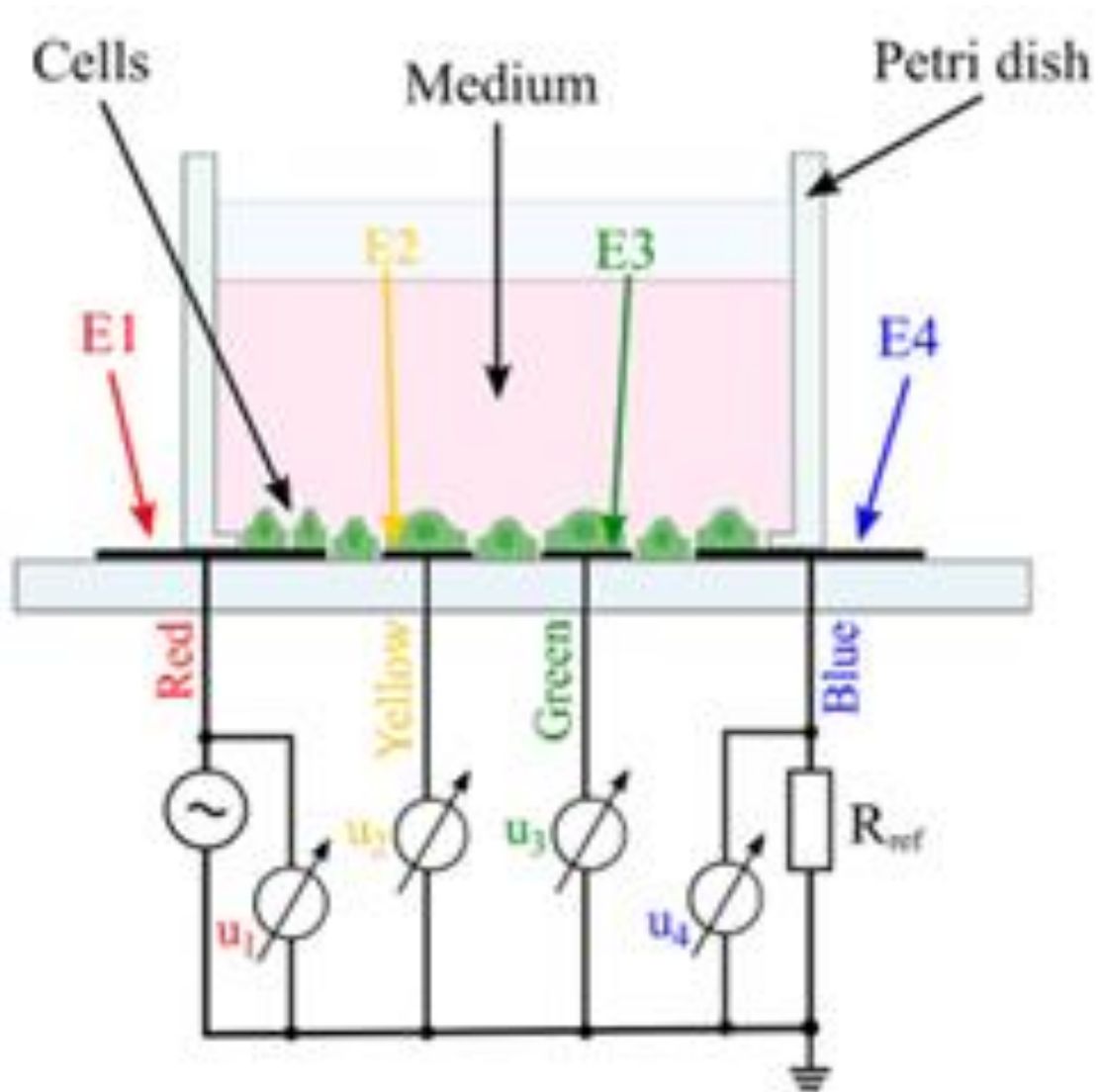
3.5. ábra: Epoxiragasztó bevonása szilikonragasztóval

3.2 BIS mérési módszer

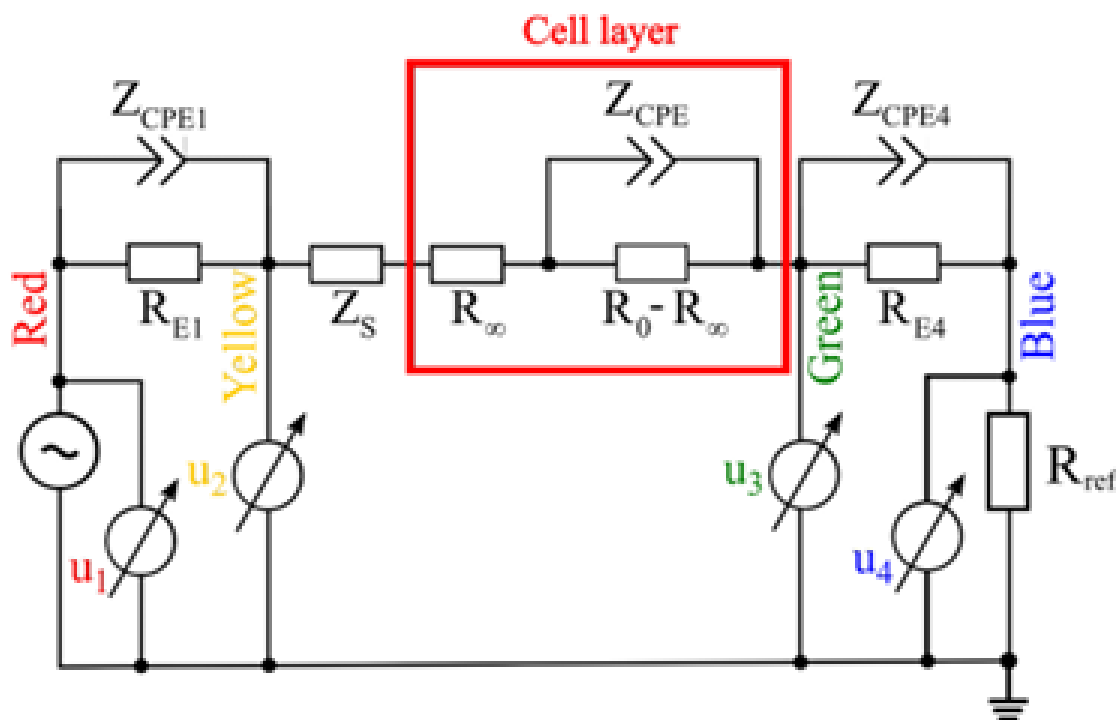
A BIS-méréseket saját fejlesztésű, módosított négyelektrodás technika alkalmazásával végeztem, amit Vizvári és munkatársai fejlesztettek ki. A lényege, hogy a gerjesztő elektrodák és a maradék impedanciák által okozott hibák egyszerre kerülnek elnyomásra. A maradék impedancia befolyásolja a mérések pontosságát, ezáltal pontatlan méréshez vezet.

A generátort közvetlenül az egyik elektrodához csatlakoztatom, a földet pedig egy ellenálláson keresztül egy másikhoz, ez hatékonyan eltolja a potenciálértékeket egy konstans értékkel. Az impedancia számítása során a konstanssal való kompenzáció és az osztás digitálisan történik, ami kiküszöböli a szimmetrikusan kialakított mérőáramkör

hibáit. Korábbi publikációkban a kutatócsoportunk bizonyította, hogy ennek az adatgyűjtési és kiértékelési módszernek az alkalmazása - más technikákhoz képest - széles frekvenciatartományban is növelheti az EIS-mérések hatékonyságát és pontosságát [33]. A mérési módszer működését a 3.6. ábra mutatja be.

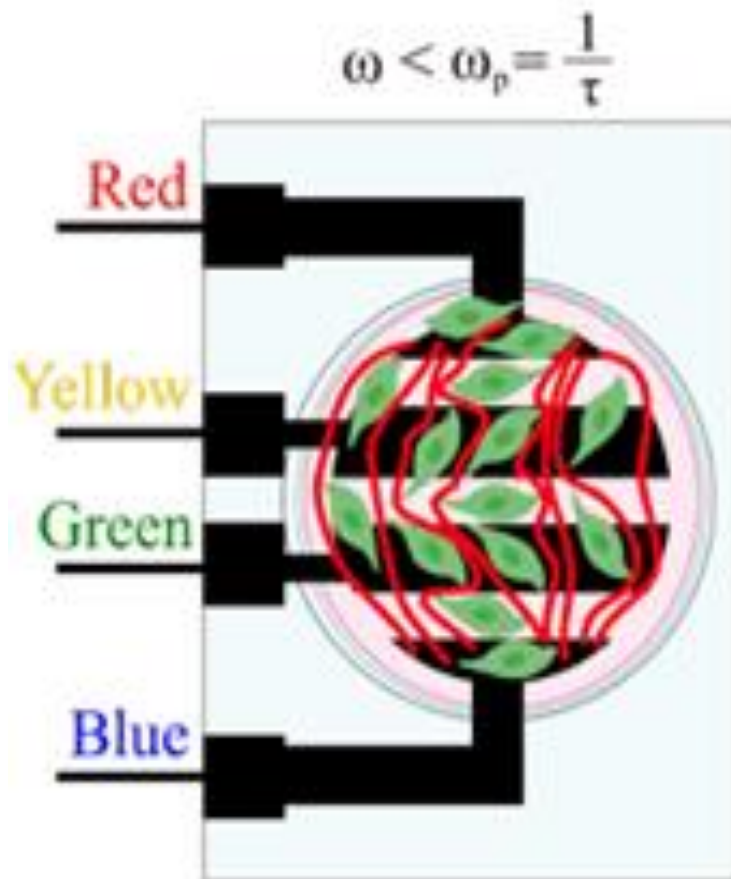


3.6. ábra: A saját fejlesztésű négyelektrodás mérési módszer alkalmazását bemutató sematikus ábra [33]



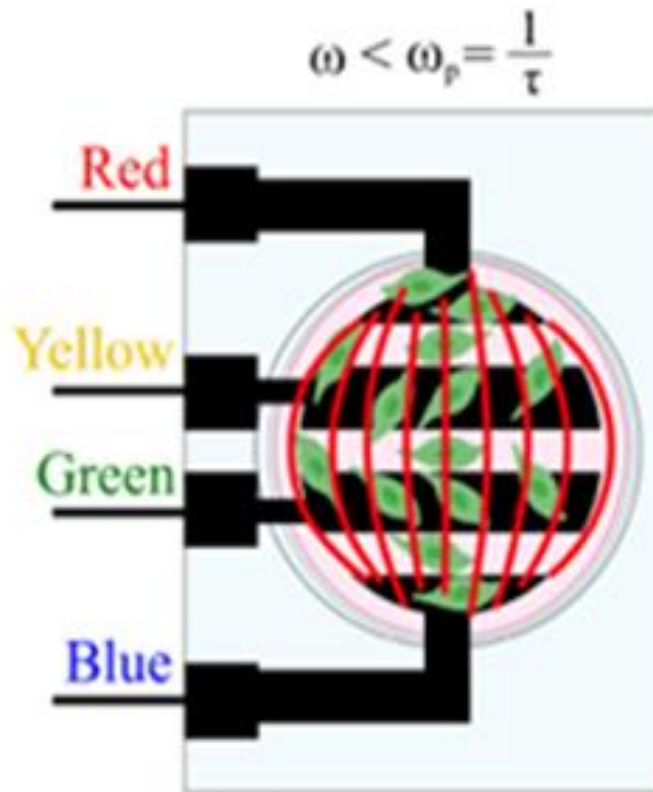
3.7. ábra: A saját fejlesztésű négyelektrodás mérőlemezek kapcsolási rajza [33]

Amint a 3.6. ábrán látható, a mérőcellával sorba van kötve egy ellenállás (R_{ref}), amely a cellán mért feszültséget egy konstans értékkel eltolja, ezért a gerjesztő elektródák (E1 és E4 a 3.2. ábrán) nem nulla potenciálon vannak, így mindkét gerjesztő elektródán elektromos kettős réteg alakul ki. A földelési pont nincs közvetlen kapcsolatban a vizsgált biológiai struktúrával, a feszültséggenerátor (E1) és az E4 elektróda között folyó áram a generátor által hordozott potenciálkülönbség eredménye. A 3.7 ábrán az E1 és E4 elektródáknál fellépő elektromos kettősréteget Z_{CPE1} , R_{E1} , Z_{CPE4} , R_{E4} és Z_S egyenértékű áramköri elemekből álló, egyszerűsített Randles-cellák jelölik. Z_S a mérőcellába helyezett oldat impedanciáját jelképezi, a konstans fázisú elemek (CPE-k, Z_{CPE1} és Z_{CPE4}) az elektródákon keletkező kapacitást foglalják magukban. Kihhasználva azt a tényt, hogy az elektromos kettősréteg hatása az elektródához közeli területen érvényesül (mivel a töltéseloszlás a gerjesztő elektródáknál maximális, és tőlük távolodva exponenciálisan csökken [26]), az E2 és E3 mérőelektrodákat külön helyeken helyeztük el [33] (3.6. ábra). A 3.7 ábrán látható áramkörben E2 (sárga) és E3 (zöld) mérési pontokat illusztrálják egyenértékű áramkörön belül, a generátortól függetlenül. A BIS technológia működését a következőkben nagyvonalakban ismertetem, a működési elv a 3.8 és a 3.9 ábrán látható.



3.8. ábra: A saját fejlesztésű BIS mérőrendszer működési elvét bemutató sematikus ábra (az ábra nem méretarányos), alacsony frekvencia alkalmazása esetén ($\omega < \omega_p$) [32]

Ha a gerjesztési frekvencia (ω) kisebb, mint a sejtréteg sajátfrekvenciája (ω_p), a sejtmembránok szigetelőként viselkednek, ezért az elektromos áram (piros vonallal jelölve) csak az extracelluláris (sejtek közötti) térben folyik (3.8. ábra). Ellenállásokat (3.7. ábra, piros téglalapban elhelyezkedő elemek) ekkor sorba kapcsoljuk a közeg impedanciájával, mivel a CPE impedanciája végtelen, ebben az esetben az extracelluláris tér ellenállásának (R_0) és a közeg impedanciájának (Z_s) eredője mérhető (3.7. ábra alapján).



3.9. ábra: A saját fejlesztésű BIS mérőrendszer működési elvét bemutató sematikus ábra (az ábra nem méretarányos), magas frekvencia alkalmazása esetén ($\omega > \omega_p$) [32]

A frekvencia növelésével a sejtmembránok vezetőképpé válnak, és a sejteken belül elektromos tér jön létre [26]. Az áramvonalak a sejtek belsejében is áthaladnak (lásd 3.9. ábra) és így az extracelluláris és intracelluláris (sejtek közötti és sejten belüli) teret egyaránt reprezentáló R_∞ ellenállás és a közeg impedanciájának eredője mérhető [33].

A vizsgálat során tenyésztett sejtek a Petri csésze teljes felületén növekednek, így az E1 és E2 elektródák felületén is jelen vannak, a gerjesztőelektródákon alakul ki elektród-elektrolit-sejt kölcsönhatás. A sejt kultúra BIS spektrumát minden egyes frekvenciapontban, a 3.6. ábra alapján, az u_2 , u_3 és u_4 potenciálértékek felhasználásával, az alábbi képlet szerint számítjuk ki [33]:

$$Z_{sejt} = R_{ref} \frac{u_2 - u_3}{u_4} \quad (3.1).$$

A módszer hatékonysága azon a tényen alapul, hogy az adatgyűjtés során közös módusú elnyomást alkalmazunk a mérési hibák és a zavarok figyelmen kívül hagyása érdekében [28]. A 3.6 és 3.7 ábrán bemutatott mérési elv lehetőséget biztosít arra, hogy a gyűjtött adatokból kiszámítsuk a mérőcellák két elektródájának (E1 és E4 között) spektrumát. A használt mérőrendszer egy nagy pontosságú digitális lock-in erősítő, amely kifejezetten kis elektromos jelek mérésére szolgáló feszültséggenerátoros gerjesztést használ. A mérőrendszer legfőbb jellemzői:

- Maximális gerjesztési feszültség: 10 V csúcstól-csúcsig (gerjesztési tartomány 110 dB)
- Maximális gerjesztési áram: 1 mA
- Mérési frekvenciatartomány: 1 mHz-100 kHz (0,01 Hz felbontással)
- A négycsatornás műszer a lock-in algoritmust IEEE 754 64 bites, kettős pontosságú tartományban hajtja végre
- A mért adatok pontossága kisebb 1 ppm-nél
- Akkumulátorról üzemeltethető (6,5 óra üzemidőt biztosít).

3.3 Fiziológias sóoldatos mérések

Az elkészült lemezek validálását fiziológias sóoldattal végeztem. Az oldatsorozat 100%-os, 75%-os, 50%-os, 25%-os és 0%-os oldatokból áll (ahol 100% a tiszta fiziológias sóoldat, 0% a tiszta steril víz), előállításukhoz steril vizet és fiziológias sóoldatot (Braun 0,9% NaCl) használtam. A megfelelő mennyiségeket pipettorral mértem egy 50 ml térfogatú falcon csőbe.

25 ml oldathoz a következő mennyiségeket adagoltam:

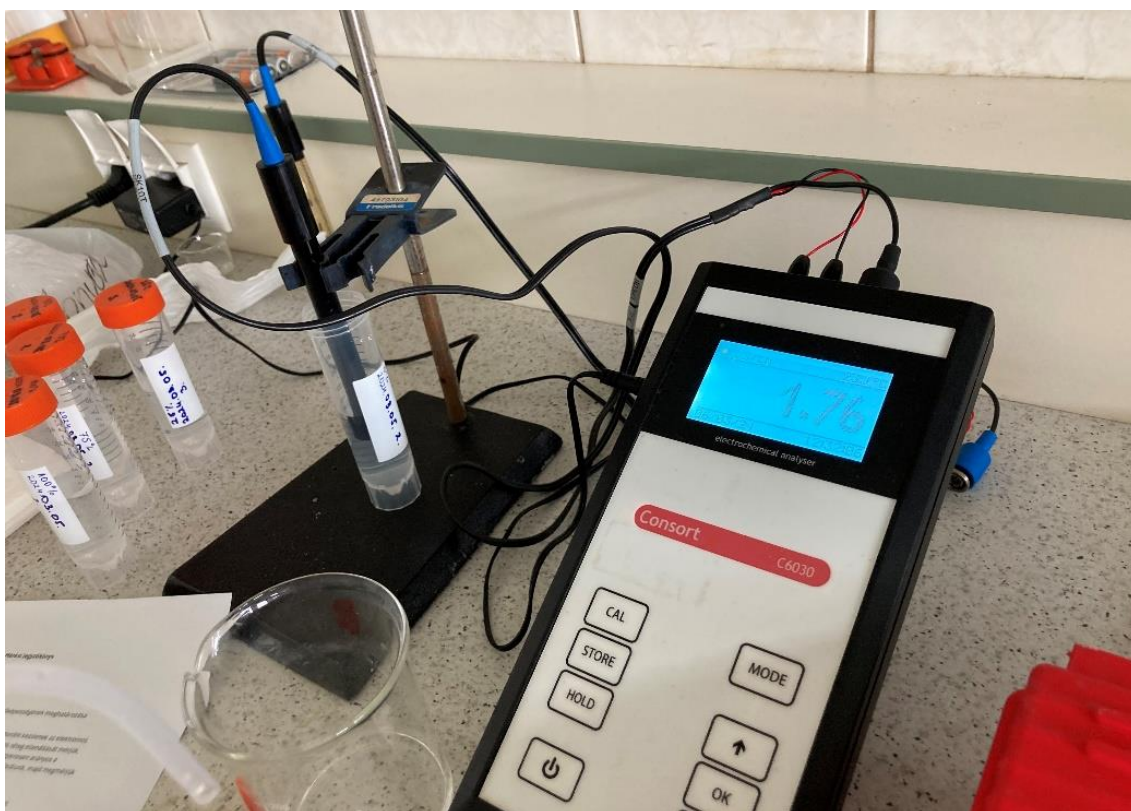
- 0%: 25 ml steril víz
- 25%: 6,25 ml fiziológias sóoldat + 18,75 ml steril víz
- 50%: 12,5 ml fiziológias sóoldat + 12,5 ml steril víz
- 75%: 18,75 ml fiziológias sóoldat + 6,25 ml steril víz
- 100%: 25 ml fiziológias sóoldat

Összesen 5 oldatsorozatot állítottam össze, így az összes méréshez 25 különböző oldatot használtam.

Az elkészült sóoldatoknak először megmértem a vezetőképességét, ehhez a PTE MIK C003-as laborjában található Consort C6030 készüléket (3.11. ábra) használtam harangelektroddal. Minden oldatnak ötször mértem meg a vezetőképességét, így $25 \cdot 5 = 125$ konduktometriás mérést végeztem. A mérésekről jegyzőkönyvet vezettem, melyek a szakdolgozat mellékletében megtalálhatóak, a mérés körülményei a 3.10 ábrán láthatóak.



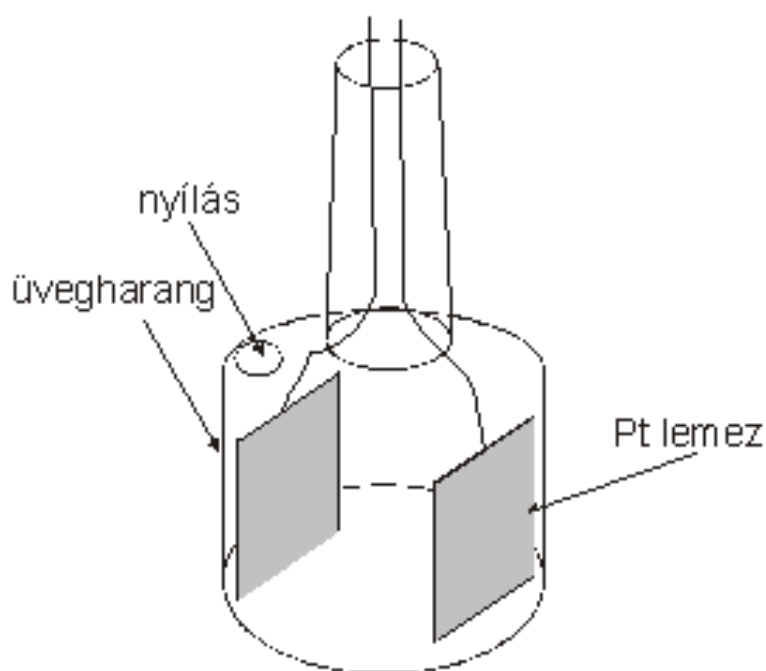
3.10. ábra: Bemérés körülményei a PTE MIK C003 laborban



3.11. ábra: Oldatsorozat bemérése a PTE MIK C003 laborban

3.3.1 A vezetőképesség mérés elve

A mérés az elektrolitréteg ellenállásának mérésén alapul, ami a két elektród közti teret tölti ki. A konduktometriás mérőcellák a mérendő oldattal galvanikus kölcsönhatásban állnak, jelen esetben az üvegharangba rögzített kolloidális platínával bevont platina elektródok (3.12 ábra). Ezek adott felületűek, egymástól adott, rögzített távolságra, így az általuk kialakított tér, azaz cella vezetőképesség értéket mérjük, mivel az ellenállás reciproka a vezetőképességnek [36].



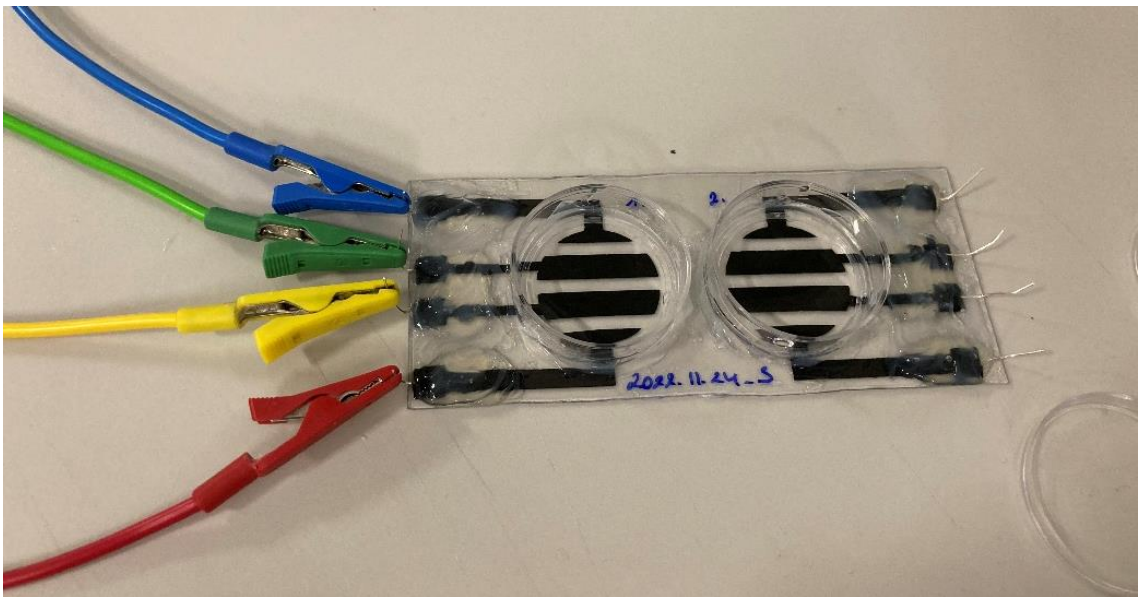
3.12. ábra: Konduktometriás harangelektrod

Ha a lemezek felülete (A) 1 cm^2 és a köztük lévő távolság (l) 1 cm , a kialakult 1 cm^3 térben mérhető vezetőképesség értéket fajlagos vezetőképességnek ($\kappa [\text{S} \cdot \text{cm}^{-1}]$) hívjuk. A nem standard méretű és formájú cellákban mért fajlagos vezetőképesség értékek összehasonlítását a cellaállandó (C_{cella}) meghatározása szolgálja. A cellaállandó az adott elektródpárra jellemző hányados, amely ismert vezetőképességű oldattal (általában $0,01 \text{ M}$ koncentrációjú KCl) határozható meg. Az elektrolit oldatokban az ionok elektromos áram hatására áramlanak, kationok a negatív, anionok a pozitív pólus irányába. Vizes oldatokat vizsgálva a víz autoprotolízisének termékei csak nagyon kis mértékben járulnak hozzá a vezetéshez, ezért a tiszta víz szigetelőnek tekinthető [37], ezért a konduktometriás vizsgálat eredménye használható az oldat iontartalmának meghatározására.

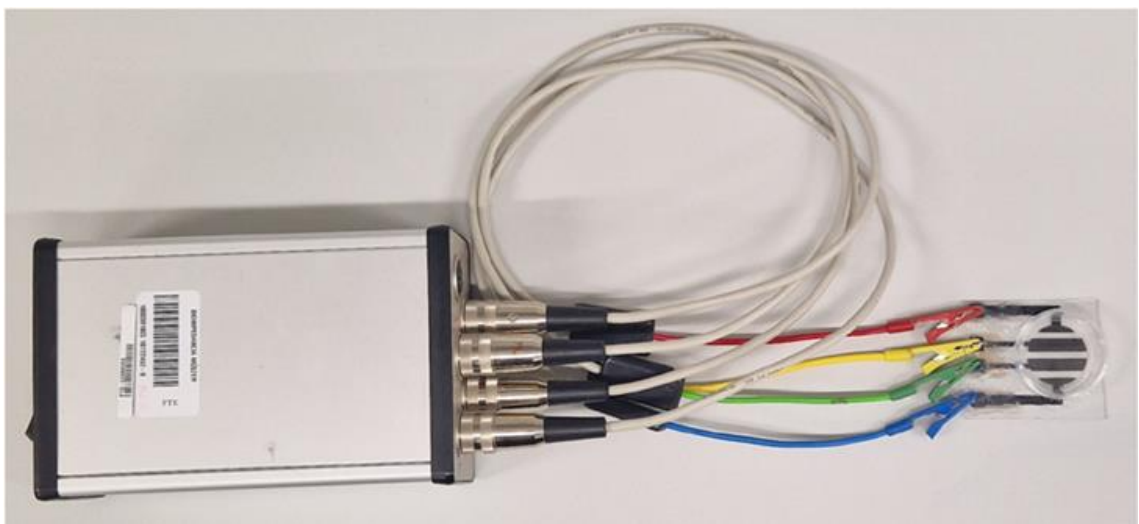
3.4 Bemérés

A mérésekhez használt mérőlapot a 3.13 ábrán láthatjuk, amely a 3.1 ábrán bemutatott tervrajz alapján készült, a leírtak szerint. A képen látható, ahogyan a mérőlaphoz csipeszekkel csatlakoztatjuk a mérőeszköz bementeit, amelyek színe és funkciója megegyezik a 3.6 ábrán bemutatottakkal:

- piros - E1 – gerjesztő elektród
- sárga – E2 – mérőelektród
- zöld – E3 – mérőelektród
- kék – E4 - gerjesztő elektród



3.13. ábra: BIS mérőműszer csatlakozása a plate-hez



3.14. ábra: BIS mérőműszer

A BIS mérések során mind az öt koncentrációból egyenként 300 µl oldatot pipettáztam az aktuális Petri-csészébe, majd a 3.14 ábrán látható műszert a plate ezüstszállaihoz kapcsoltam a 3.13 ábrán szemléltetett módon.

Ezután a műszert USB bemeneten keresztül csatlakoztattam egy laptophoz, amin elindítottam a mérő szoftvert, a következő beállításokat adtam meg:

- 20 dB generátorjel-csillapítás (1 V csúcstól csúcsig)
- Frekvenciasöpítés 0,1 Hz-100 kHz frekvenciatartományban (dekádonként 5 pont).

A BIS méréseket elindítottam, és egymás után ötször megismételtem, majd cseréltem az oldatot, növekvő sókoncentrációt alkalmaztam. A 3.15 ábrán ábrázoltam az összes mérést: az oszlopok jelölik a plate sorozatokat, a sorok a sorozat tagjait. Mindegyik oszlophoz tartozik 5 különböző koncentrációjú oldat, amit a függőleges téglalapok jelölnek, a töménységet a szín sötétedésével szemléltettem. Mindegyik oldattal 5 mérést végeztem, amiket kis színes körökkel jelöltem. Így 5 plate sorozat * 5 darab plate * 5 koncentráció * 5 ismétlés = 625 mérési fájl dolgoztam fel.



A 3.16. ábra a bemérés körülményeit ábrázolja a Szentágotthai Kutatóközpontban, a kutatócsoport laborában. A képen egy pipettával a mérőlemez Petri-csészéjébe mérek oldatot, emellett látható maga a mérőműszer is, a laptopon elindított mérőprogram kezelőfelülete. Mivel ebben a laborban sejtes kísérleteket is végzünk, ezért fontos a biztonság, ezért gumikesztyűt és laborköpenyt viselünk.



3.16. ábra: BIS bemérés körülményei a SzKK. laborban

A fájlok kiértékeléséhez 3 frekvenciát választottam: 1 Hz, 100 Hz, 10 kHz.

4 Eredmények ismertetése

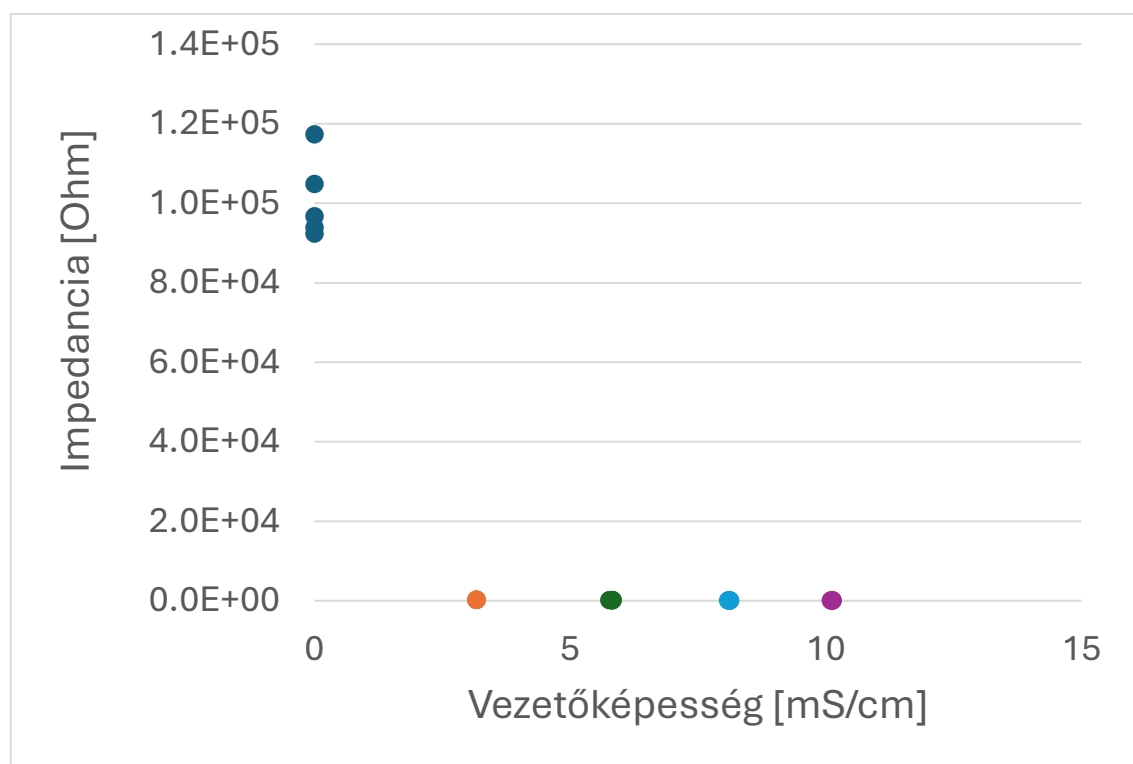
Az elvégzett méréseket cvs fájlként mentettem, amiket táblázatkezelő szoftverbe importálva tudtam kezelni. A táblázat segítségével megkaptam az egyes mérésekhez tartozó impedancia értékeket frekvencia függvényében. Az azonos plate-hez tartozó mérések eredményeit összesítettem egy-egy fájlban. Az első munkalapon a kiszámított impedanciaértékeket ábrázoltam táblázatos formában (itt még az összes mért frekvencián). A 2. munkalapon a méréshez használt oldatok vezetőképesség értékeit és az impedanciaértékeket a kiválasztott frekvenciákon (4.1. táblázat).

	<i>Vezetőképesség</i>	<i>1 Hz-en mért impedancia</i>	<i>100 Hz-en mért impedancia</i>	<i>10 kHz-en mért impedancia</i>
0%	0.0039	117250.05	122130.79	135579.92
	0.0019	104829.52	104517.95	112254.49
	0.0017	96639.07	94233.73	98658.49
	0.0016	93859.19	90621.65	93968.85
	0.0017	92354.55	88639.33	91437.04
25%	3.17	182.97	136.19	124.32
	3.17	183.98	136.29	124.52
	3.17	184.06	136.80	125.29
	3.17	183.19	135.98	124.64
	3.17	182.59	135.41	124.13
50%	5.77	94.50	70.21	63.55
	5.82	94.14	69.85	63.23
	5.83	93.93	69.57	63.01
	5.83	93.75	69.37	62.86
	5.82	93.67	69.28	62.80
75%	8.09	61.62	45.27	40.88
	8.12	61.49	45.24	40.83
	8.12	61.39	45.14	40.75
	8.13	61.32	45.06	40.68
	8.13	61.25	44.99	40.63
100%	10.10	49.83	36.81	33.06
	10.13	49.52	36.62	32.88
	10.12	49.31	36.42	32.71
	10.13	49.20	36.33	32.62
	10.13	49.11	36.25	32.55

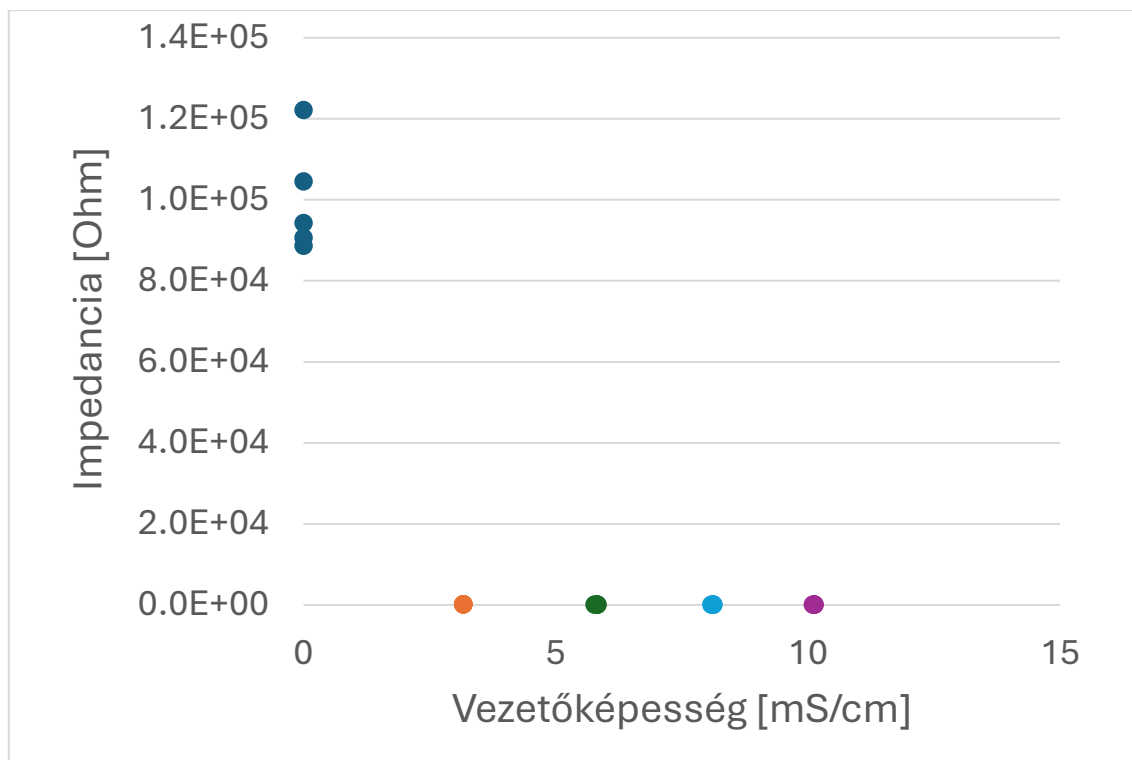
4.1. táblázat: 24.04.11_1 plate bemérésének adatai (a használt oldatok vezetőképessége és impedanciája)

Ezeknek a táblázatoknak a felhasználásával az impedanciaértékeket a vezetőképesség értékek függvényében ábrázoltam, a 3 választott frekvenciát külön-külön.

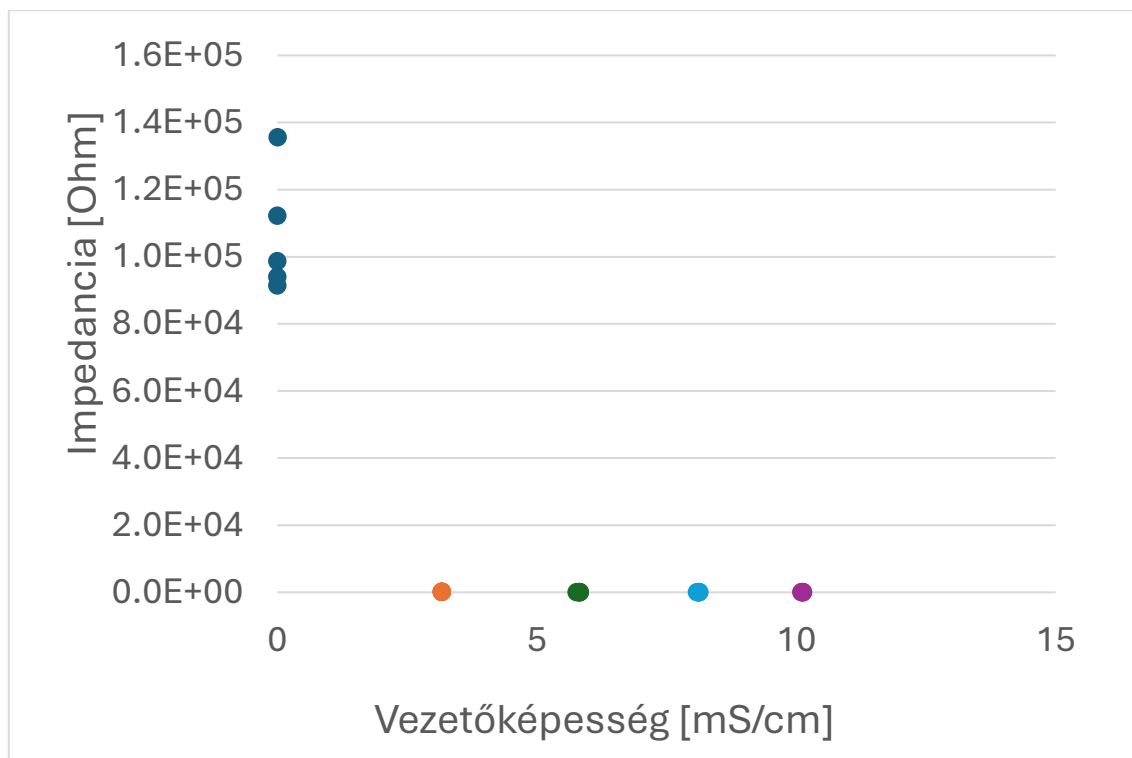
A következőkben 24.04.11_1 plate-en bemutatom hogyan ábrázoltam a kapott adatokat, a többi diagram mellékletként megtekinthető. A 4.1, 4.2, 4.3 ábrán láthatóak az 1, 100 és 10 kHz-en mért impedanciaértékek, a vízszintes tengely a vezetőképesség értékeket jelöli [mS/cm] mértékegységben, a függőleges tengelyen pedig az impedancia értékek szerepelnek [Ohm] mértékegységgel. Az adatpárokat pontok jelölik, azonos koncentrációjú adatpárok azonos színnel ábrázolva: 0% sötétkékkel, 25% narancssárgával, 50% zölddel, 75% világoskékkel, 100% lilával.



4.1. ábra: 24.04.11_1 plate kalibrációja 1 Hz frekvencián

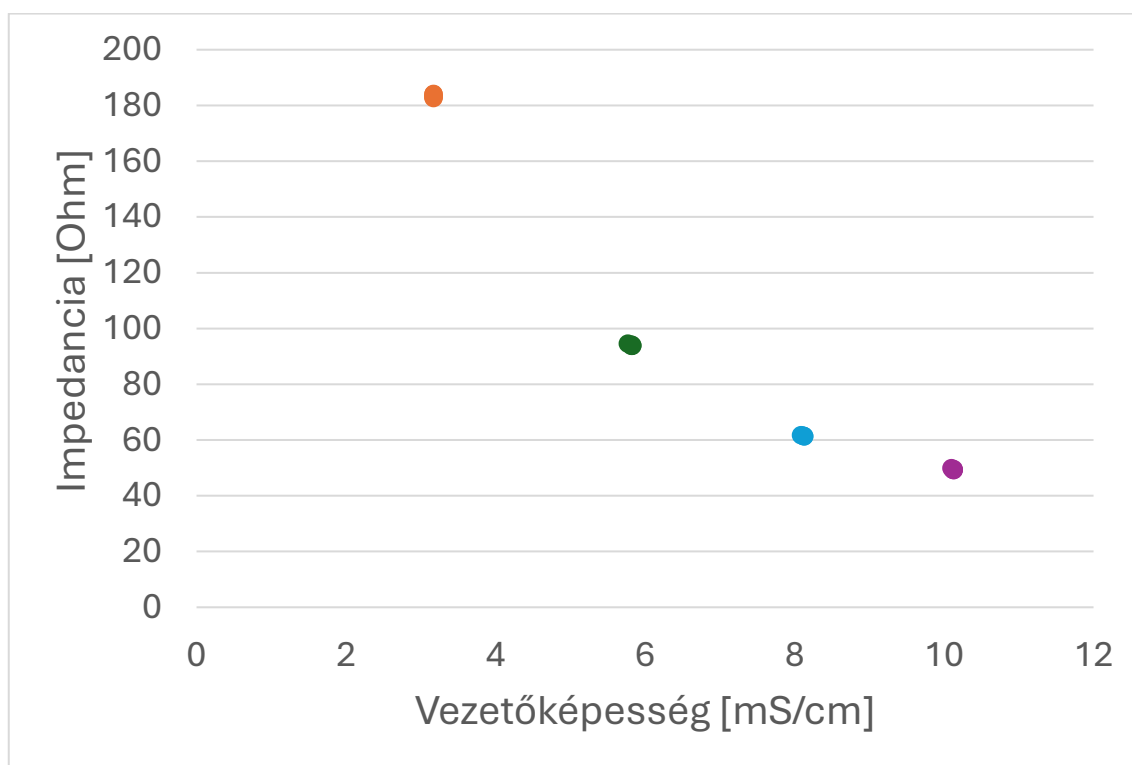


4.2. ábra: 24.04.11_1 plate kalibrációja 100 Hz frekvencián

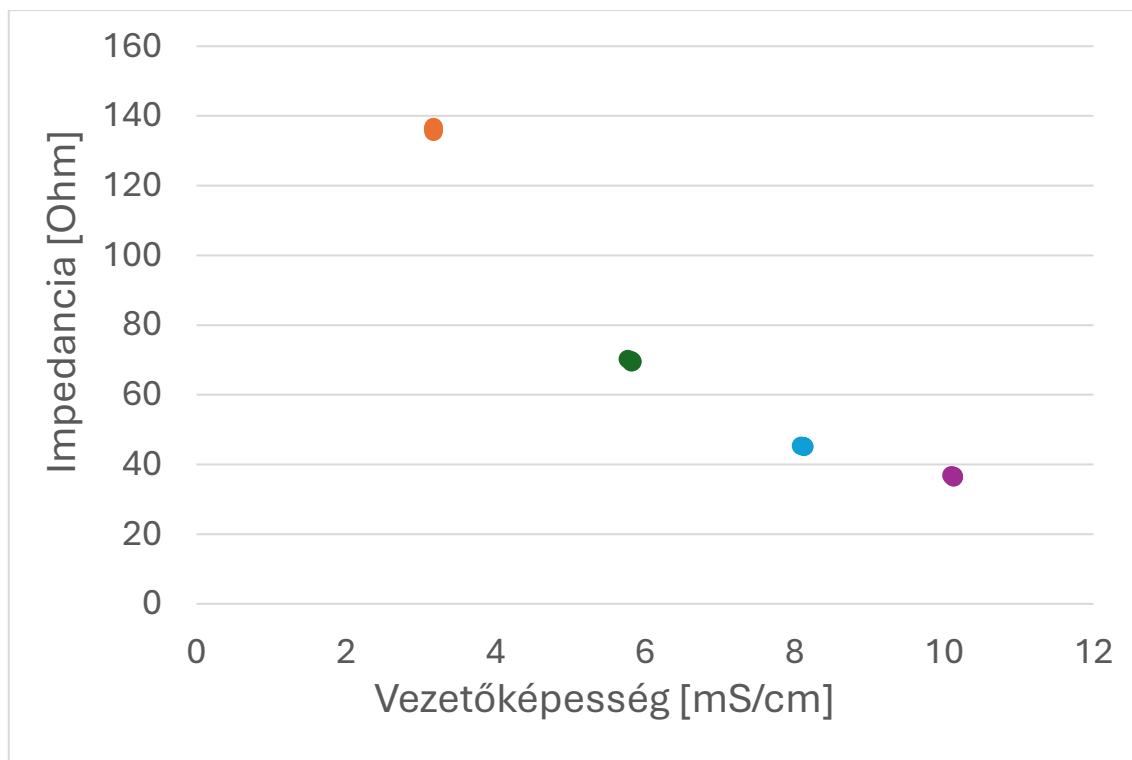


4.3. ábra: 24.04.11_1 plate kalibrációja 10 kHz frekvencián

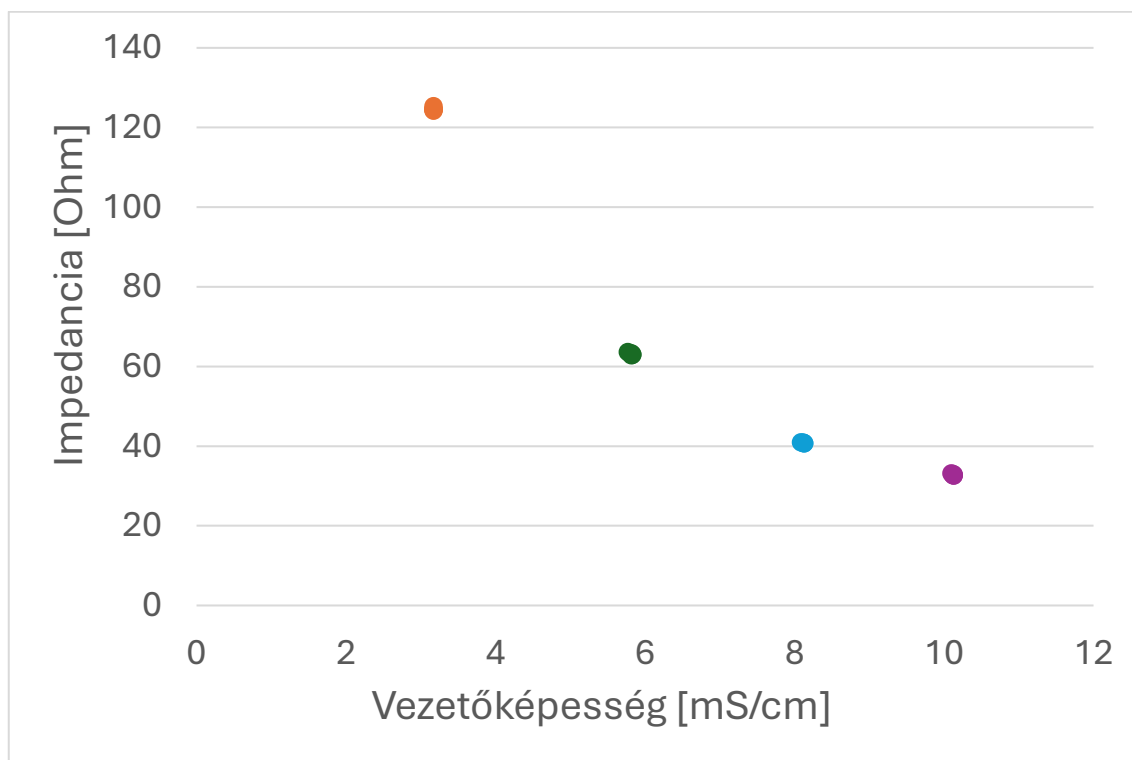
A 0%-os oldattal történő mérés nagyságrendekkel magasabb értékeket vesz fel, emiatt a többi töménység értékei arányosan nem ábrázolhatóak vele együtt, ezért outlier adatnak tekintettem, a vizsgálat során ezeket az adatokat kizártam. Így létrehoztam azokat a diagramokat, melyeken a 0%-hoz tartozó adatok nem szerepelnek. (4.4. ábra, 4.5. ábra, 4.6. ábra)



4.4. ábra: 24.04.11_1 plate kalibrációja 1 Hz frekvencián, 0% adatsor kizárásával

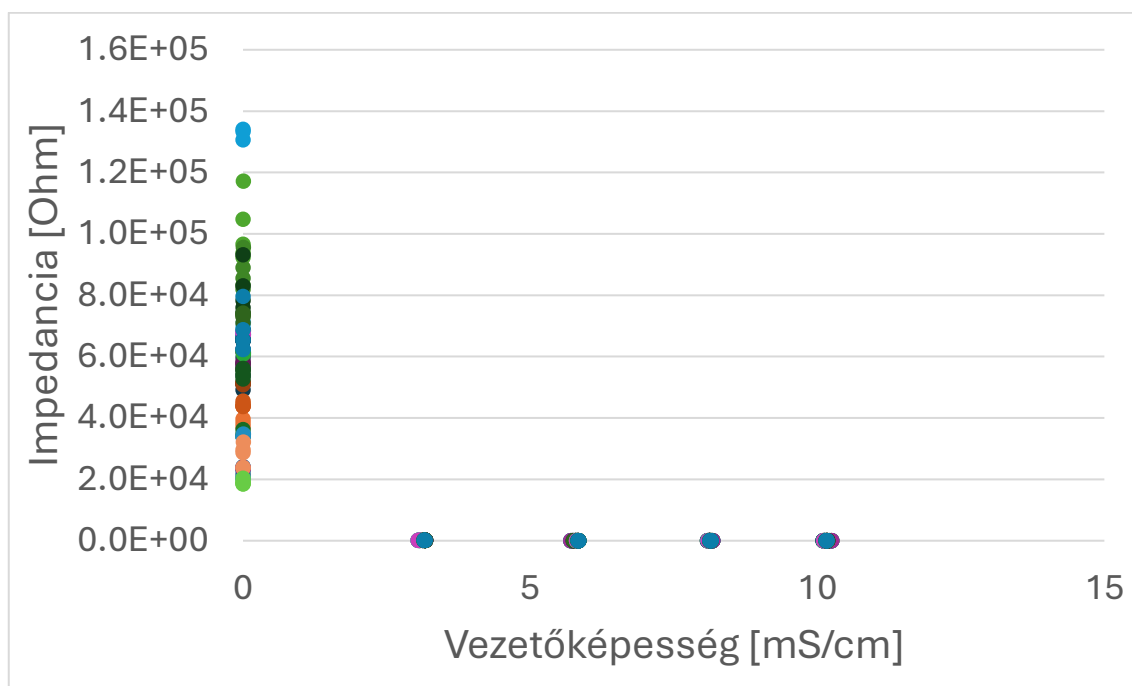


4.5. ábra: 24.04.11_1 plate kalibrációja 100 Hz frekvencián, 0% adatsor kizárásával

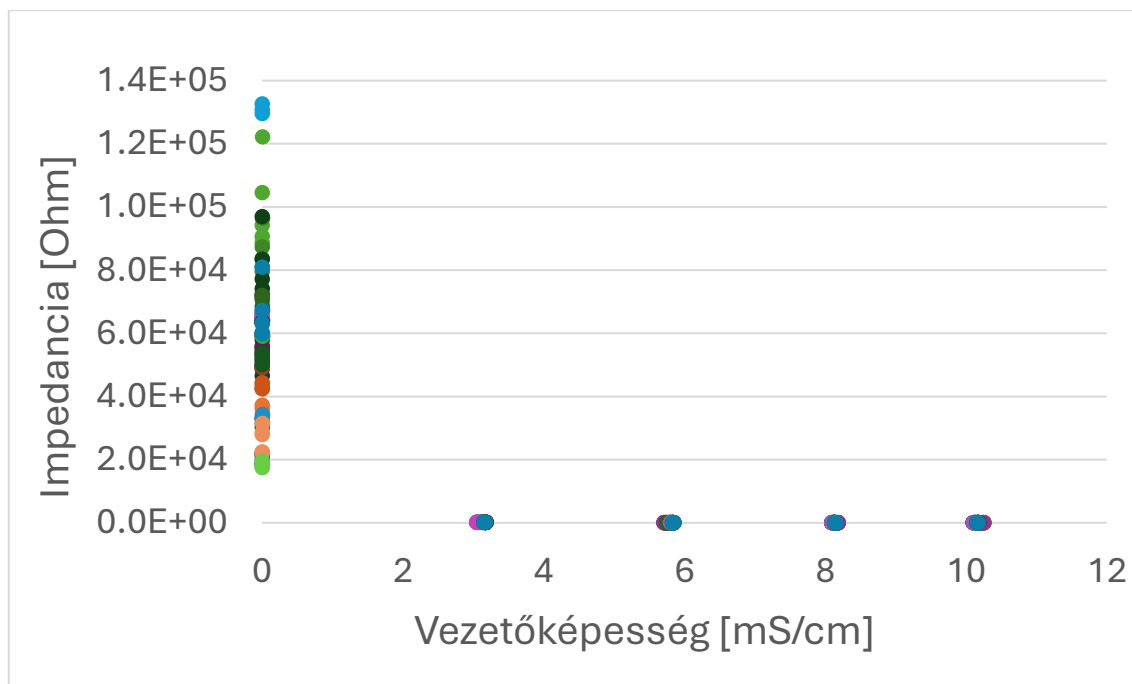


4.6. ábra: 24.04.11_1 plate kalibrációja 10 kHz frekvencián, 0% adatsor kizárásával

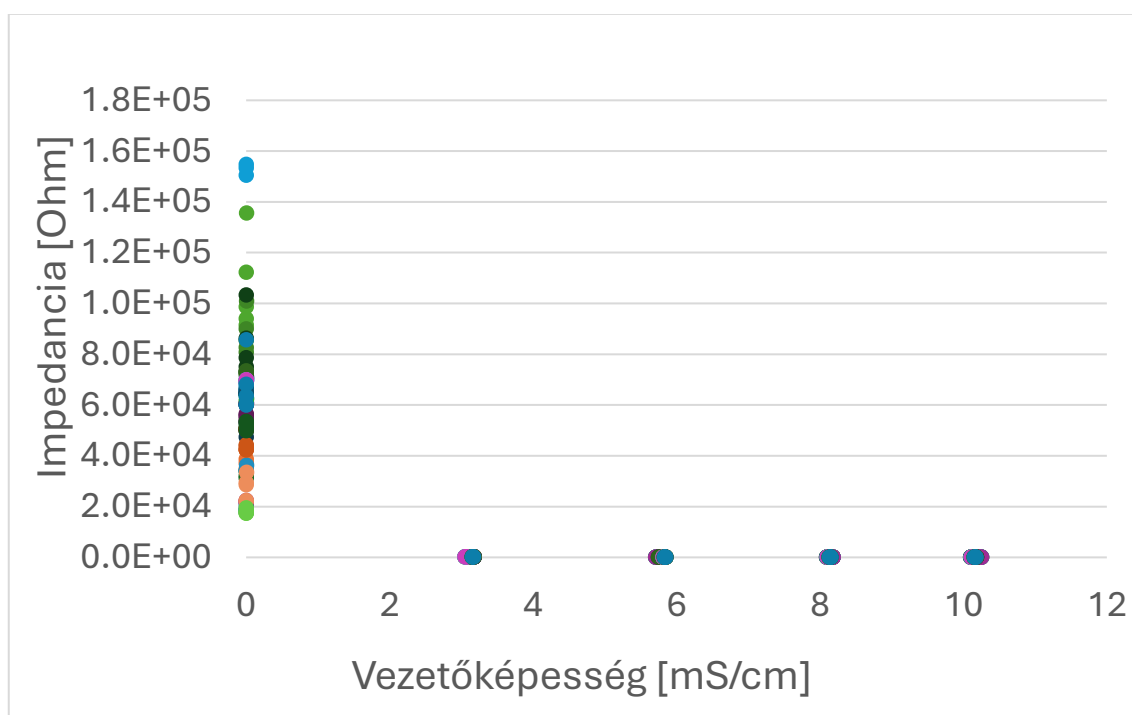
Ahhoz, hogy a plate-eket egymással össze tudjam hasonlítani, létrehoztam három diagramot (4.7. ábra, 4.8. ábra, 4.9. ábra), melyen az összes plate-hez tartozó összes adat szerepel a választott frekvencián. Itt ugyanúgy ahol egyesével, az impedanciát a vezetőképesség függvényében ábrázoltam, itt a különböző színek különböző plate-et jelölnek. Mivel itt csupán a tendencia fontos, ezért az egyes jelöléseket (színvariációkat) nem magyarázom.



4.7. ábra: Az összes impedancia érték a beméréshez használt oldat vezetőképességének függvényében 1 Hz-en

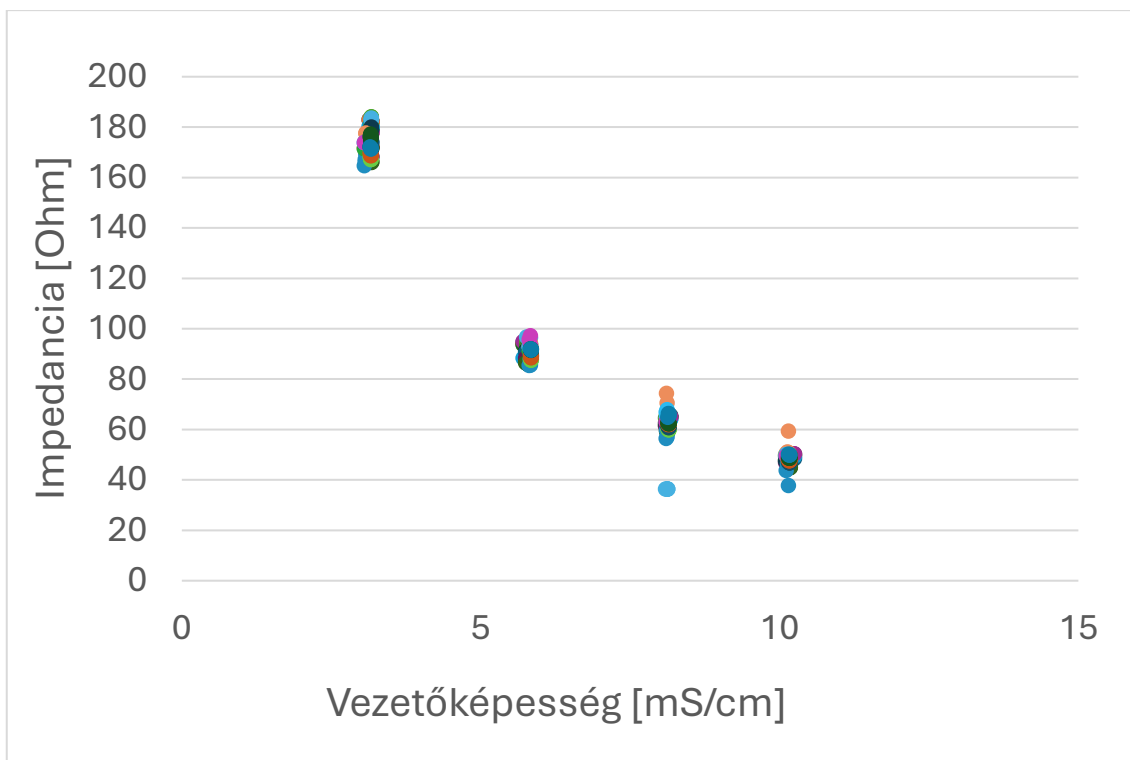


4.8. ábra: Az összes impedancia érték a beméréshez használt oldat vezetőképességének függvényében 100 Hz-en

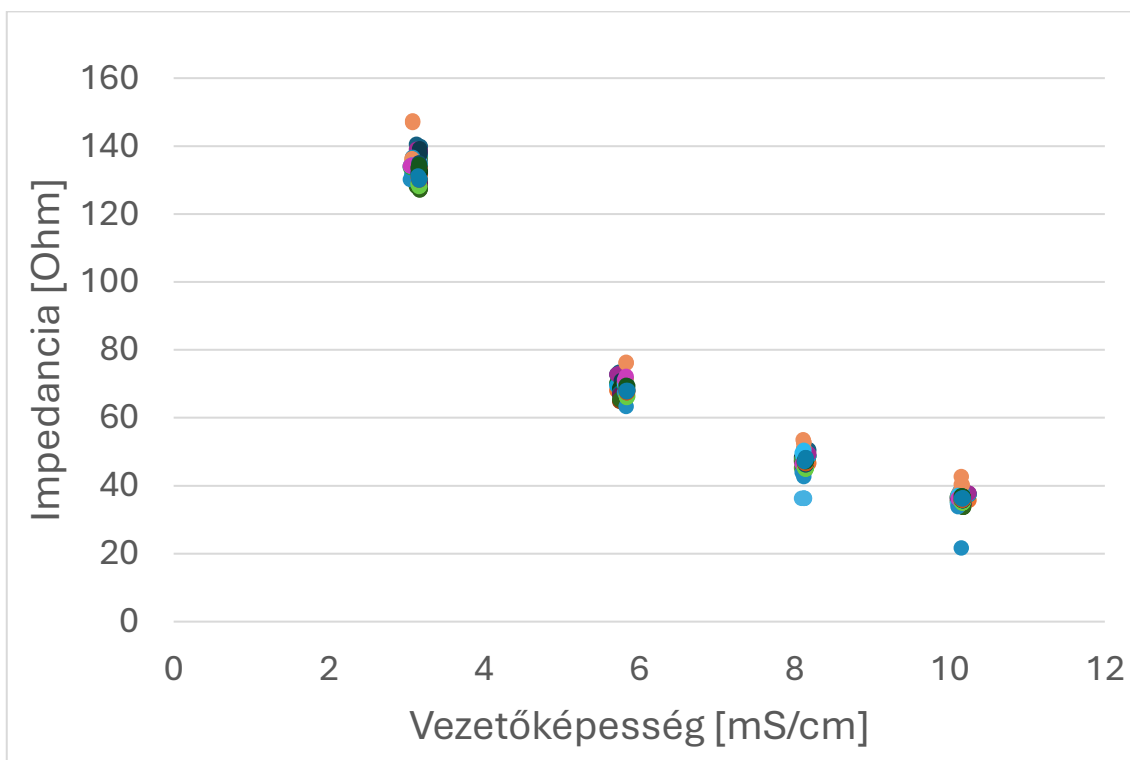


4.9. ábra: Az összes impedanciaérték a beméréshez használt oldat vezetőképességének függvényében 10 kHz-en

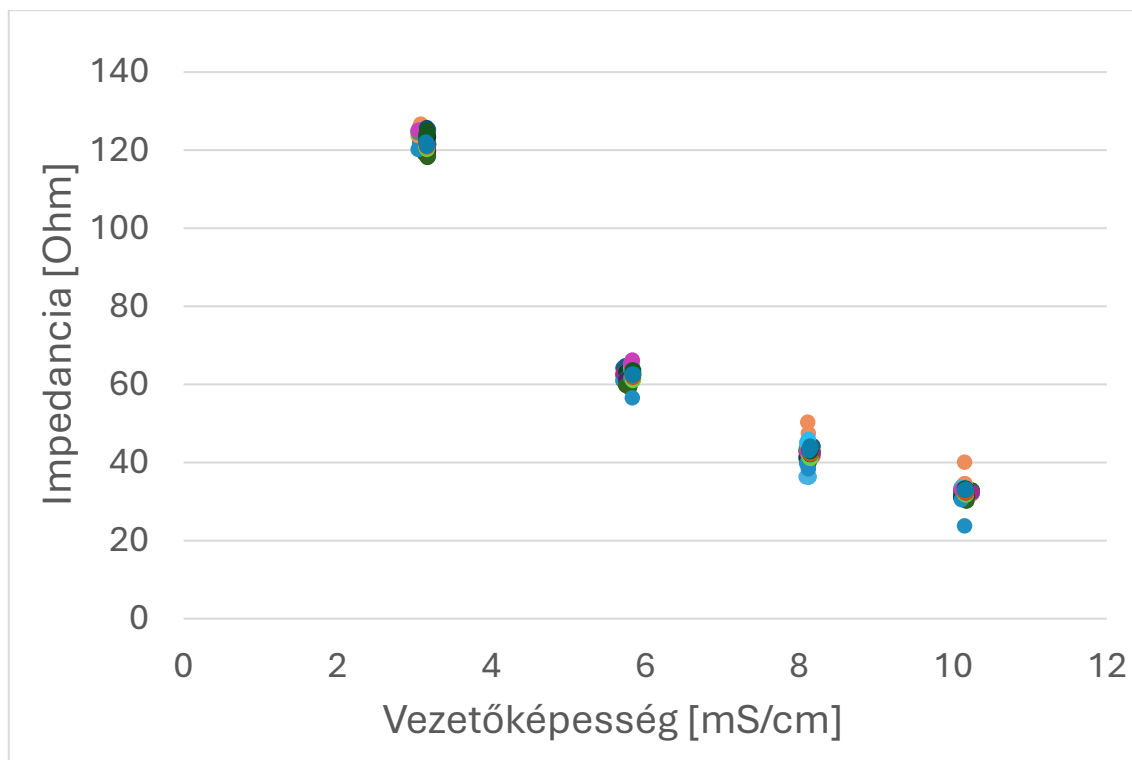
Az összesítő diagramokon is úgy jártam el, mint az egyes mérőlapok esetében, 0% adatsort kizártam, és így vizsgáltam a kalibrációs görbét (4.10. ábra, 4.11. ábra, 4.12. ábra).



4.10. ábra: Az összes impedanciaérték a beméréshez használt oldat vezetőképességének függvényében 1 Hz-en, 0%-os adatsor kizárásával



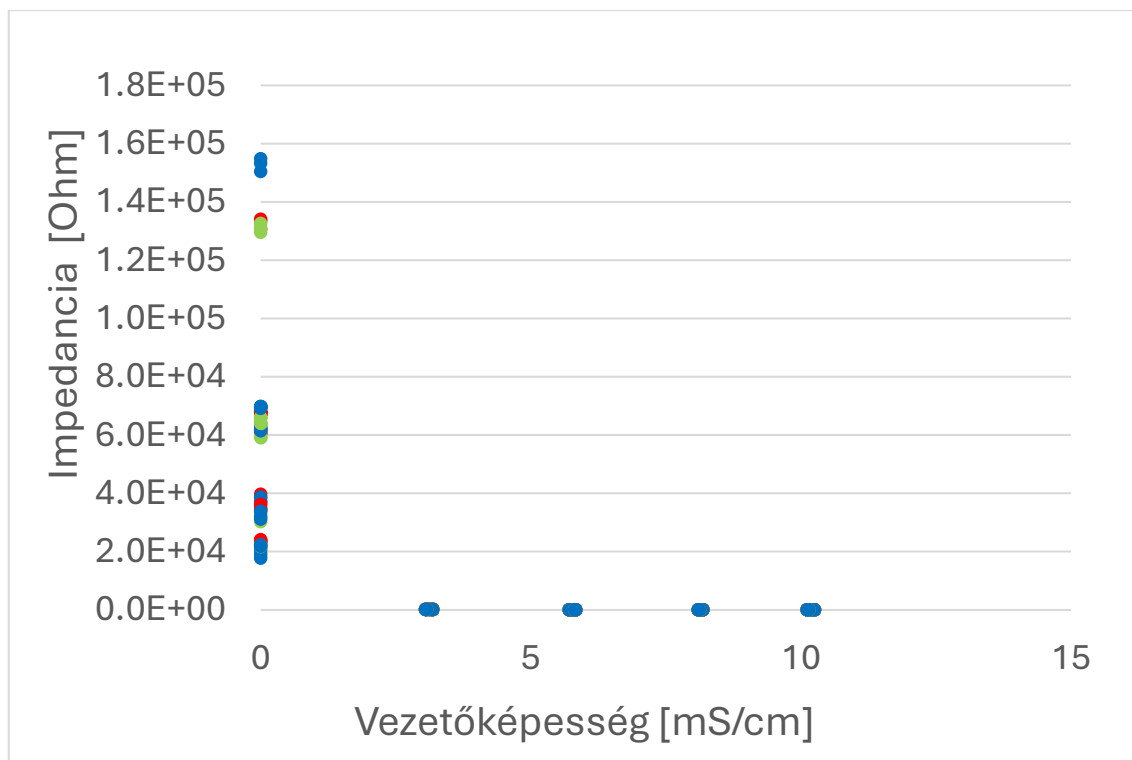
4.11. ábra: Az összes impedanciaérték a beméréshez használt oldat vezetőképességének függvényében 100 Hz-en, 0%-os adatsor kizárásával



4.12. ábra: Az összes impedanciaérték a beméréshez használt oldat vezetőképességének függvényében 10 kHz-en, 0%-os adatsor kizárásával

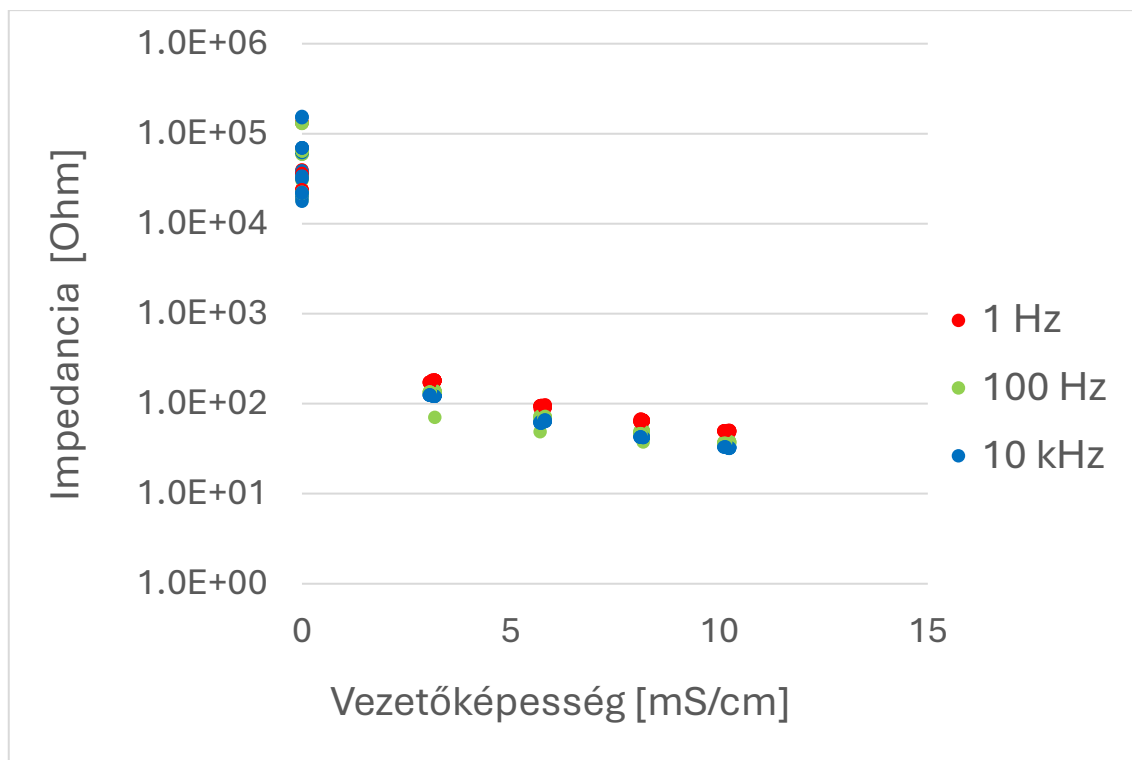
4.1 Diszkusszió

Ahhoz, hogy a mérőlapokat összehasonlítva, globálisan tudjam vizsgálni, létrehoztam azokat a diagramokat, amiken mindegyik plate bemérési adatai látszódnak mindhárom választott frekvencián, összesítve (4.13. ábra). Itt y tengelyen az impedanciaértékeket, [Ohm] mértékegységben ábrázoltam, a vezetőképesség függvényében, melyet [mS/cm] mértékegységben adtam meg. Az egyes adatpárokat színes korongok jelölik, a pirosak az 1 Hz-et, a zöldek a 100 Hz-et, kékek pedig a 10 kHz-et.



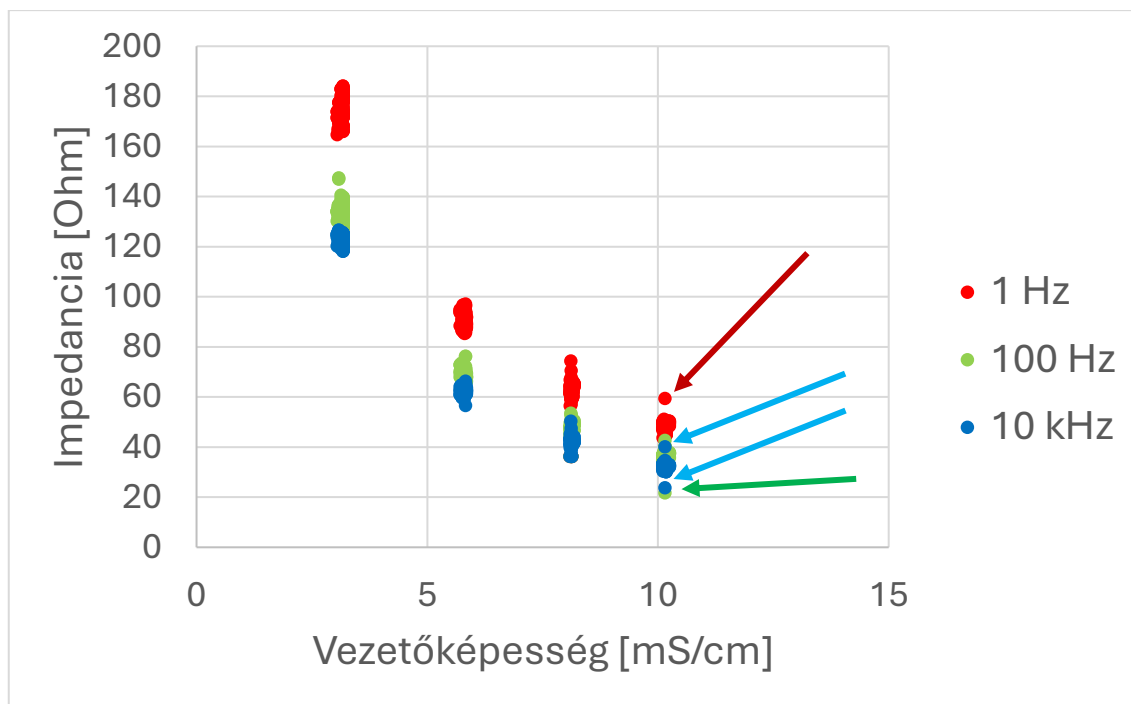
4.13. ábra: Az impedanciaértékek a beméréshez használt oldat vezetőképességének függvényében

Ahogy az egyes plate-ek esetében, itt is 0%-os oldat bemérési adatai jelentősen eltérnek a töményebb sóoldatok impedanciájától, olyannyira, hogy azok közti eltérés nem is észlelhető a diagram alapján. Ahhoz, hogy a nagyságrendi eltérést szemléltessem, létrehoztam a 4.14 ábrát, amin y tengelyt, vagyis az impedanciát logaritmikus skálán ábrázoltam. Itt leolvasható, hogy a 0%-os steril víz impedanciája körülbelül 3 nagyságrenddel nagyobb a többinél.



4.14. ábra: Impedanciaértékek a beméréshez használt oldat vezetőképességének függvényében (y tengely logaritmikus)

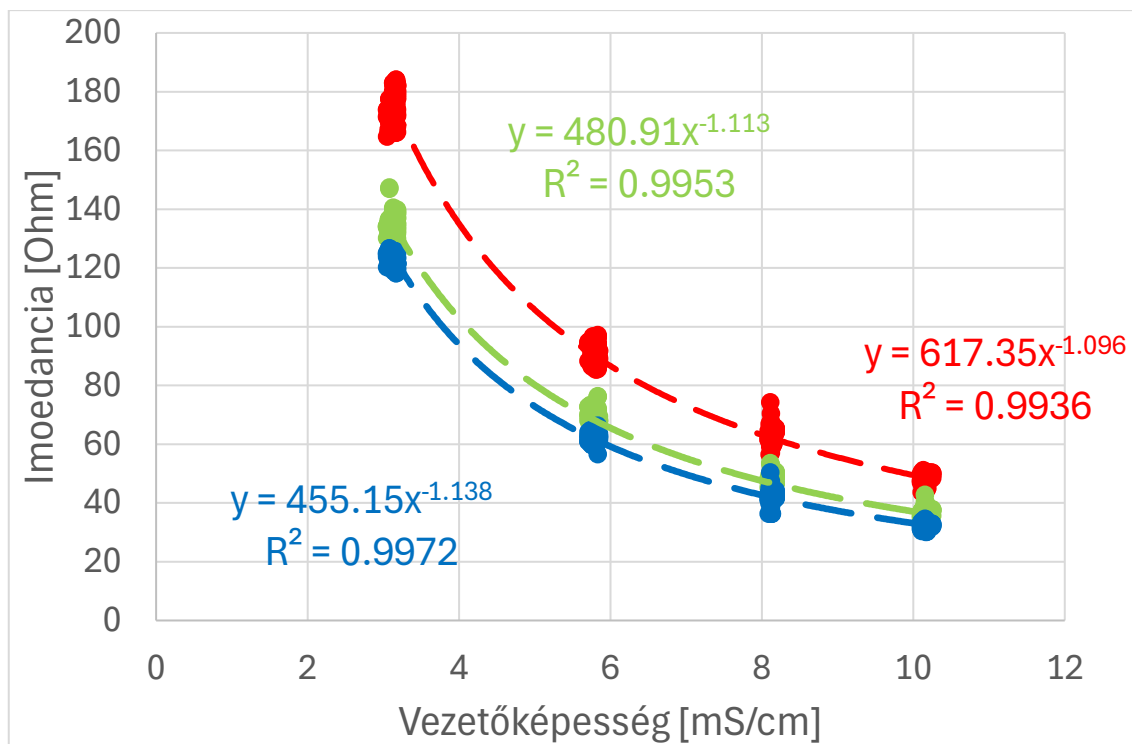
Következő lépésként 0% nélkül, 25%, 50%, 75% és 100% impedancia adatait ábrázoltam a vezetőképességek függvényében (4.15. ábra). Itt már minden adat látható, 20 és 200 közötti impedanciát vesznek fel, illetve az adatok görbét alkotnak.



4.15. ábra: Impedanciaértékek a beméréshez használt oldat vezetőképességének függvényében, outlier adatpárok jelölésével

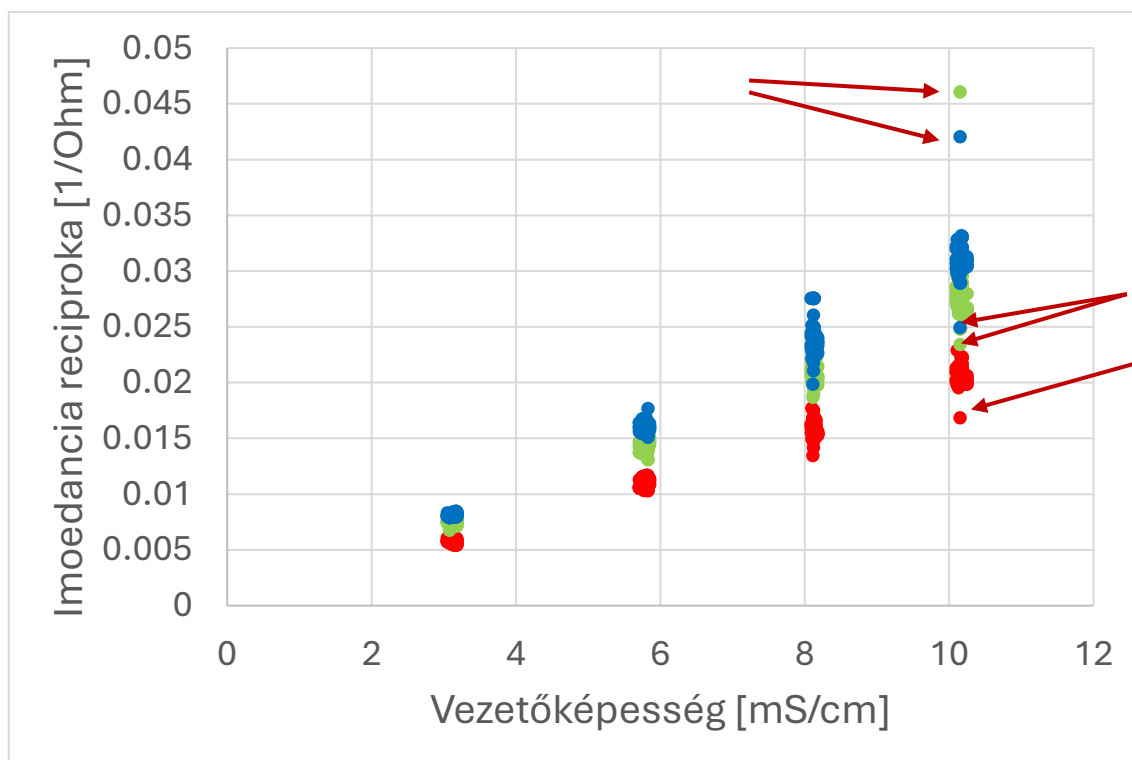
A 4.15. ábra görbéjére függvényt illesztettem. Legmagasabb (0,99 feletti) regressziót az outlier adatok (vörös, kék és zöld nyilakkal jelölve) kizárása után a hatványfüggvénnyel értem el (4.16. ábra). Az ábrán szaggatott vonal jelöli a pontokra illesztett kalibrációs görbét, piros, zöld és kék színnel. Mindhárom függvény esetében az alap kitevője kerekítve -1, tételelesen:

- piros- 1 Hz: $y = 617,35 x^{-1,096}$ $R^2 = 0,9936$
- zöld - 100 Hz: $y = 480,91 x^{-1,113}$ $R^2 = 0,9953$
- kék - 10 kHz: $y = 455,15 x^{-1,138}$ $R^2 = 0,9972$.



4.16. ábra: Kalibrációs görbe függvénye (hatványfüggvény)

Mivel -1 hatványkitevő megegyezik az alap reciprokéval, ezért reciprokfüggvényt feltételeztem. Ahhoz, hogy ezt bizonyítsam, az impedanciaértékek reciprokát vettem, majd ezeket az adatokat a vezetőképesség függvényében ábrázoltam (4.17. ábra).



4.17. ábra: Impedancia reciproka a vezetőképesség függvényében

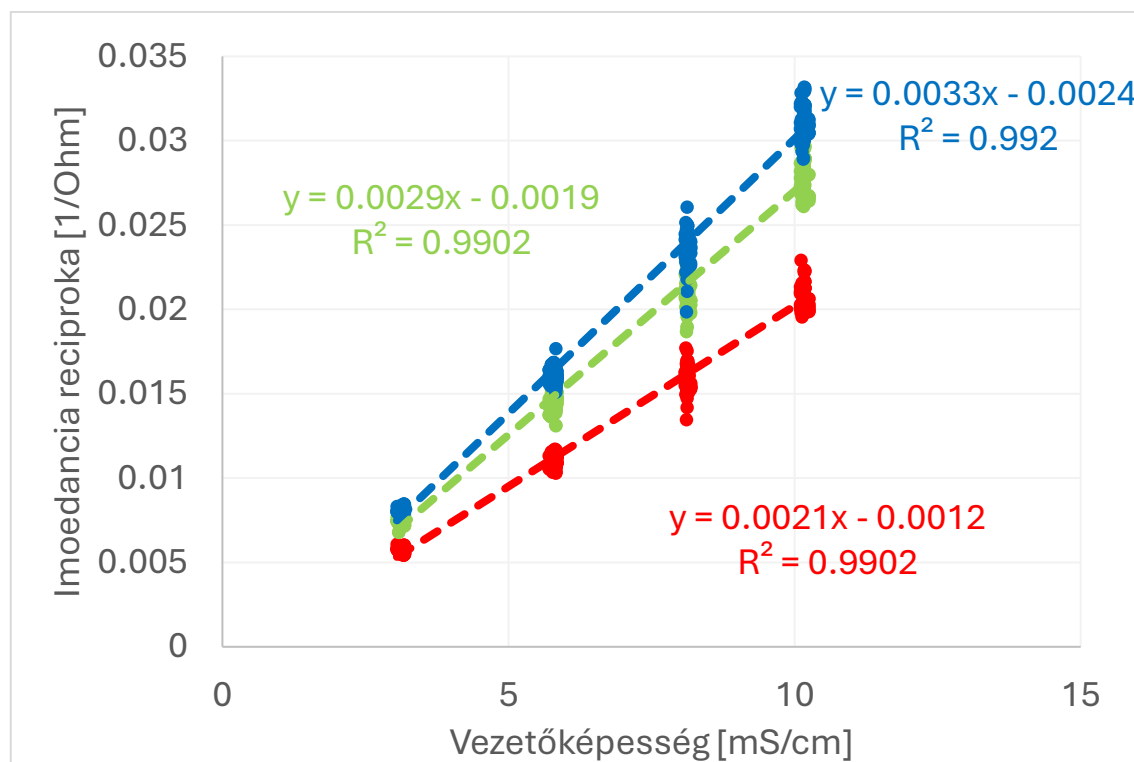
Az outlier adatok (4.17. ábra, vörös nyilakkal jelölve) kiszűrése után a kapott adatokra egyenest illeszttem (4.18. ábra, piros, zöld és kék szaggatott vonal), a kapott egyenesek regressziója 0.99 feletti, egyenleteik:

- piros- 1 Hz: $y = 0,0021x - 0,0012$ $R^2 = 0,9902$
- zöld - 100 Hz: $y = 0,0029x - 0,0019$ $R^2 = 0,9902$
- kék - 10 kHz: $y = 0,0033x - 0,0024$ $R^2 = 0,992$.

Mindhárom függvény egyenlete „ $y = a \cdot x + b$ ” alakú, ami a lineáris regresszió alkalmazása esetén az egyenes egyenlete, ahol

- a: az egyenes meredeksége,
- b: a függvény és az y tengely metszéspontja.

Utóbbi, a „b” tag mindhárom függvény esetében nagyon kicsi, ezért a függvények megközelítőleg az origóból erednek, ez a mérés jellegéből adódóan a fizikai háttérrel igazolható, miszerint, ha az oldatban nincs ion, ami vezetővé teszi az oldatot, akkor nem mérhető vezetőképesség.



4.18. ábra: Kalibrációs egyenes az impedancia reciprok adataira

Az összesítő diagramon (4.15. ábra) látszik, hogy a kalibrációs görbék hasonló lefutásúak, mint a mérőlemeznek egyesével: mind a négy koncentráció esetén

legmagasabb értéket vesz fel 1 Hz frekvencián, alacsonyabbat 100 Hz-en, legalacsonyabbat pedig 10 kHz-en, matematikai szabályszerűség miatt reciprok diagramon a sorrend pont fordítva.

A kalibrációs görbékről elmondható, hogy alap esetben nem lineáris lefutásúak, hanem reciprokfüggvényel jellemezhetők. A 4.18. ábradiagramon az impedancia reciprokát ábrázoltam a vezetőképesség függvényében, a görbére ilyen formában egyenes illeszthető.

A beméréshez használt oldat sókoncentrációjának növelésével az impedancia egyre csökken, a vezetőképesség pedig növekszik. A kalibrációs egyenesek meredeksége (vagyis a cellaállandó) kis mértékben tér el a 3 különböző frekvencián, azonban elmondható, hogy a frekvencia növelésével a meredekség növekszik.

Jól látszik, hogy az adatpárok felhőket alkotnak, hasonló értékeket vesznek fel, szórásuk (0% kivételével) kicsi.

5 Konklúzió

A munkám elején áttekintettem a kutatócsoport korábbi, számomra releváns publikációit, illetve a tudomány jelenlegi állását tükröző BIS méréseket bemutató irodalmakat. Megvizsgáltam, hogy a rendelkezésre álló fizikai modellek miként képesek segíteni a céljaim elérését, felkutattam a probléma kezeléséhez legközelebb álló elméleti alapokat. Mérőlapokat készítettem a kutatócsoport által fejlesztett technika szerint, 5 plate sorozatot gyártottam, amelyek 5 tagot tartalmaznak, összesen 25 darabot készítettem. A validálásukhoz fiziológiás sóoldatsorozatokot állítottam elő 5 különböző sókoncentrációval (0%, 25%, 50%, 75%, 100%), mindegyik plate sorozathoz 1 sóoldatsorozat, vagyis 5 oldat tartozik, összességében 25 különböző oldatot hígítottam. Az oldatoknak megmértem a vezetőképességét, mindegyik oldatnál 5-ször ismételttem meg, így összesen 125 konduktometriás vizsgálatot végeztem. Az oldatokat ezután a plate-ek beméréséhez használtam: a méréseknél növekvő sókoncentrációt alkalmaztam, a megfelelő mennyiség kimérése után lefuttattam a műszeres mérést, mindegyik koncentrációval 5 mérést végeztem, így összesen 625 mérési fájlom keletkezett. Ezeket táblázatkezelő szoftver segítségével kiértékeltem, majd újabb táblázatokat létrehozva egyenként, frekvenciánként és összesítve is vizsgáltam, összehasonlítottam, diagramokat állítottam elő az adatokból.

Dolgozatomban a konduktometriás kalibráció módszerének adaptálhatóságát vizsgáltam a BIS mérésekre. A kalibrációs görbéken (4.16. ábra) látható, hogy a kalibrációs görbe nem lineáris lefutású, tehát a hagyományos vezetőképesség méréseknél alkalmazott kalibráció nem alkalmazható ebben a formában, mert ezekre az adatokra egyenes nem illeszthető. Az impedancia adatok reciprokát kell venni, így már egyenest alkotnak az eredmények (lásd 4.18. ábra), és alkalmazhatjuk a lineáris regressziót.

A kalibrációs egyenesek egyenként és összesítve is hasonló lefutásúak, ezért a kalibrációs módszerről megállapítható, hogy reprodukálható. Az adatpárok felhőket alkotnak, a mérőlapok és az előállított sóoldatok mért impedancia és vezetőképesség értékei nagyságrendileg azonosak.

A kalibrációs technológia kidolgozottnak tekinthető, a kísérleteim alapján a gyakorlatban alkalmazhatónak bizonyult. Javaslom, hogy a kutatócsoport és egyéb felhasználók a mérőlapok készítésénél és kalibrálásánál azt a folyamatot alkalmazzák, amit a dolgozatomban kifejtettem!

6 Irodalomjegyzék

- [1] d. K. A. Lajos, „Soksejtűekből izolált túlélő rendszerek vizsgálata: in vitro (ex vivo) módszerek,” in *Szövettani és sejtbiológiai vizsgálómódszerek*, Budapest, 2012, p. 165.
- [2] [Online]. Available: <https://www.egeszsegvonal.gov.hu/gyermekvallalas/mesterseges-megtermekenyites.html>.
- [3] L. P. C. I. M. & S. T. S. Freedman, „The economics of reproducibility in preclinical research,” *PLoS Biol.*, p. 13, 2015.
- [4] M. Baker, „1,500 scientists lift the lid on reproducibility,” *Nature*, p. 533, 2016.
- [5] H. T. N. K. J. P. J. & C. S. Le, „A review of electrical impedance characterization of cells for label-free and real-time assays,” *BioChip J.*, p. 13, 2019.
- [6] M. Gheorghiu, „A short review on cell-based biosensing: Challenges and breakthroughs in biomedical analysis,” *J. Biomed. Res.*, p. 35, 2021.
- [7] S. & W. J. Lukic, „Impedimetric Monitoring of Cell-Based Assays,” 2015.
- [8] D. S. Holder, „Brief introduction to bioimpedance,” in *Electrical Impedance Tomography*, 2004, pp. 411-421.
- [9] H. K. (. Gupta, *Encyclopedia of Solid Earth Geophysics*, Springer , 2021.
- [10] R. P. Areny, „Tetrapolar bioimpedance measurements compared to four-wire resistance measurements,” *J. Electr. Bioimped.*, p. 9, 2018.

- [11] I. K. F. A. & B. M. R. Showkat, „A review of bio-impedance devices,” *Med. Biol. Eng. Comput.*, %1. kötet61, pp. 927-950, 2023.
- [12] H. Lukaski, „Biological indexes considered in the derivation of the bioelectrical impedance analysis,” *Am. J. Clin. Nutr.*, %1. kötet64, pp. 397S-404S, 1996.
- [13] U. KYLE, „Bioelectrical impedance analysis. Part i: Review of principles and methods,” *Clin. Nutr.*, %1. kötet23, pp. 1226-1243, 2004.
- [14] U. G. e. a. Kyle, „Bioelectrical impedance analysis—part II: Utilization in clinical practice,” *Clin. Nutr.*, %1. kötet23, pp. 1430-1453, 2004.
- [15] M. Y. & M. H. Jaffrin, „Body fluid volumes measurements by impedance: A review of bioimpedance spectroscopy (BIS) and bioimpedance analysis (BIA) methods,” *Med. Eng. Phys.*, %1. kötet30, pp. 1257-1269, 2008.
- [16] H. W. e. a. Kim, „Differentiation between normal and cancerous human urothelial cell lines using micro-electrical impedance spectroscopy at multiple frequencies,” *J. Med. Biol. Eng.*, %1. kötet39, pp. 86-95, 2018.
- [17] B. & F. T. J. Fu, „Estimating localized bio-impedance with measures from multiple redundant electrode configurations,” *2018 40th Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society (EMBC)*, 2018.
- [18] T. K. Bera, „Bioelectrical impedance methods for noninvasive health monitoring: A review,” *J. Med. Eng.*, %1. kötet, összesen: %21-28, p. 2014, 2014.
- [19] M. L. T. L. L. & M. D. S. Gelsinger, „Cell line classification using electric cell-substrate impedance sensing (ECIS),” *Int. J. Biostat.*, 2019.

- [20] I. & K. C. R. Giaever, „Monitoring fibroblast behavior in tissue culture with an applied electric field,” *Proc. Natl. Acad. Sci.*, %1. kötet81, pp. 3761-3764, 1984.
- [21] P. B. A. B. A. & W. J. Puetz, „Laser-scribed graphene (LSG) as new electrode material for impedance-based cellular assays,” *Sens. Actuators B*, %1. kötet321, p. 128443, 2020.
- [22] A. e. a. Chmayssem, „New microfluidic system for electrochemical impedance spectroscopy assessment of cell culture performance: Design and development of new electrode material,” *Biosensors*, %1. kötet12, p. 452, 2022.
- [23] F. e. a. Meani, „Electrical impedance spectroscopy for ex-vivo breast cancer tissues analysis,” *Ann. Biomed. Eng.*, 2023.
- [24] J. R. e. a. Aggas, „Real-time monitoring using multiplexed multi-electrode bioelectrical impedance spectroscopy for the stratification of vascularized composite allografts: A perspective on predictive analytics,” *Bioengineering*, %1. kötet10, p. 434, 2023.
- [25] H. S. X. C. X. D. X. & Y. L. Wang, „Discrimination between human normal renal tissue and renal cell carcinoma by dielectric properties using in-vitro BIA,” *Front. Physiol.*, 2023.
- [26] D. D. e. a. Stupin, „Bioimpedance spectroscopy: Basics and applications,” *ACS Biomater. Sci. Eng.*, %1. kötet7, pp. 1962-1986, 2021.
- [27] T. M. J. A. Z. Z. B. Š. M. K. & A. H.-J. Iwakura, „Electric cell-substrate impedance sensing in kidney research,” *Nephrol. Dial. Transpl.*, %1. kötet36, pp. 216-223, 2019.
- [28] Z. e. a. Vizvari, „Physical validation of a residual impedance rejection method during ultra-low frequency bio-impedance spectral measurements,” *Sensors*, %1. kötet20, p. 4686, 2020.

- [29] Z. e. a. Vizvari, „A multi-channel electrical impedance meter based on digital lock-in technology,” *Pollack Period*, %1. kötet14, pp. 211-222, 2019.
- [30] N. e. a. Györfi, „Development of bioimpedance-based measuring systems for diagnosis of non-alcoholic fatty liver disease,” *2021 IEEE 15th International Symposium on Applied Computational Intelligence and Informatics (SACI)*, 2021.
- [31] L. e. a. Nadasdi, „Preparation and validation of self-developed bioimpedance electrode array for measurement of tumor cells,” *2021 IEEE 15th International Symposium on Applied Computational Intelligence and Informatics (SACI)*, 2021.
- [32] D. R.-T. J. & M. M. Naranjo-Hernández, „Fundamentals, recent advances, and future challenges in bioimpedance devices for healthcare applications,” *J. Sens.*, %1. kötet, összesen: %21-42, 2019.
- [33] Z. G. N. M. G. e. a. Vizvari, „Reproducibility analysis of bioimpedance-based self-developed live cell assays,” *Sci Rep*, %1. kötet14, p. 16380, 2024.
- [34] L. R. E. L. T. D. P. R. S. Z. T. S. C. H. a. I. P. E. K. Lenzi, „Reliability of Poisson–Nernst–Planck Anomalous Models for Impedance Spectroscopy,” *J. Phys. Chem. B*, %1. kötet123, pp. 7885-7892, 2019.
- [35] L. R. Evangelista, Impedance spectroscopy of a cell: The role of ions, 2006.
- [36] D. K. A., Bevezetés a környezetvédelmi analitikába I., PTE PMMFK, Pécs, 2004.

7 Ábrajegyzék

2.1. ábra: Elektrolitikus cella vázlata.....	7
3.1. ábra: A grafénalapú BIS-lemez tervrajza (a méretek milliméterben megadva) [33]	10
3.2. ábra: Grafén felvitele stencil használatával	11
3.3. ábra: Ezüsthuzal és Petri-csésze rögzítése	11
3.4. ábra: Ezüsthuzal rögzítése epoxi ragasztóval	12
3.5. ábra: Epoxiragasztó bevonása szilikonragasztóval.....	12
3.6. ábra: A saját fejlesztésű négyelektródás mérési módszer alkalmazását bemutató sematikus ábra [33]	13
3.7. ábra: A saját fejlesztésű négyelektródás mérőlemezek kapcsolási rajza [33]	14
3.8. ábra: A saját fejlesztésű BIS mérőrendszer működési elvét bemutató sematikus ábra (az ábra nem méretarányos), alacsony frekvencia alkalmazása esetén ($\omega < \omega_p$) [32]....	15
3.9. ábra: A saját fejlesztésű BIS mérőrendszer működési elvét bemutató sematikus ábra (az ábra nem méretarányos), magas frekvencia alkalmazása esetén ($\omega > \omega_p$) [32]	16
3.10. ábra: Bemérés körülményei a PTE MIK C003 laborban	19
3.11. ábra: Oldatsorozat bemérése a PTE MIK C003 laborban.....	19
3.12. ábra: Konduktometriás harangelektród.....	20
3.13. ábra: BIS mérőműszer csatlakozása a plate-hez	21
3.14. ábra: BIS mérőműszer	21
3.15. ábra: BIS mérések számának szemléltetése	23
3.16. ábra: BIS bemérés körülményei a SzKK. laborban	24
4.1. ábra: 24.04.11_1 plate kalibrációja 1 Hz frekvencián	26
4.2. ábra: 24.04.11_1 plate kalibrációja 100 Hz frekvencián	27
4.3. ábra: 24.04.11_1 plate kalibrációja 10 kHz frekvencián	27
4.4. ábra: 24.04.11_1 plate kalibrációja 1 Hz frekvencián, 0% adatsor kizárásával.....	28
4.5. ábra: 24.04.11_1 plate kalibrációja 100 Hz frekvencián, 0% adatsor kizárásával...	29
4.6. ábra: 24.04.11_1 plate kalibrációja 10 kHz frekvencián, 0% adatsor kizárásával...	29
4.7. ábra: Az összes impedancia érték a beméréshez használt oldat vezetőképességének függvényében 1 Hz-en	30
4.8. ábra: Az összes impedancia érték a beméréshez használt oldat vezetőképességének függvényében 100 Hz-en	31
4.9. ábra: Az összes impedanciaérték a beméréshez használt oldat vezetőképességének függvényében 10 kHz-en	31

4.10. ábra: Az összes impedanciaérték a beméréshez használt oldat vezetőképességének függvényében 1 Hz-en, 0%-os adatsor kizárásával	32
4.11. ábra: Az összes impedanciaérték a beméréshez használt oldat vezetőképességének függvényében 100 Hz-en, 0%-os adatsor kizárásával	32
4.12. ábra: Az összes impedanciaérték a beméréshez használt oldat vezetőképességének függvényében 10 kHz-en, 0%-os adatsor kizárásával	33
4.13. ábra: Az impedanciaértékek a beméréshez használt oldat vezetőképességének függvényében.....	34
4.14. ábra: Impedanciaértékek a beméréshez használt oldat vezetőképességének függvényében (y tengely logaritmikus)	35
4.15. ábra: Impedanciaértékek a beméréshez használt oldat vezetőképességének függvényében, outlier adatpárok jelölésével	36
4.16. ábra: Kalibrációs görbe függvénye (hatványfüggvény).....	37
4.17. ábra: Impedancia reciproka a vezetőképesség függvényében	37
4.18. ábra: Kalibrációs egyenes az impedancia reciprok adataira	38