

DIPLOMATERV

Sántha Balázs

2005.

Melléklet: feladatkiírás

DSP alapú mérőrendszer konfluens sejtréteg transzcelluláris impedanciájának mérésére

A sejtleletani (in vitro), valamint a keringési és kardio-vaszkuláris (in vivo) kutatásokban a barrier funkció jellemzéséhez leggyakrabban használt mérési adat a vizsgált sejtréteg vagy érfal átteresztőképességének (permeabilitásának) a mértéke. In vitro körülmények között, sejtenyészetekben, a permeabilitás mérésére több technikát is kidolgoztak. Ezek során többnyire változó pórus méretű membránra növesztik rá a sejteket, majd egy ismert méretű, jelzett anyag átjutását illetve átjutásának sebességét követik nyomon. Egy másik eljárás szerint a folytonos, konfluens sejtréteg villamos ellenállásának értékével jellemezhető a permeabilitás. Nehéz ugyanakkor megvalósítani, hogy a membrán egész felületén a sejtréteg konfluens, azaz folytonos legyen. Egy újabb eljárás szerint a transzcelluláris ellenállás (TER) méréséhez a sejteket kisméretű (250 μm átmérőjű) arany elektródokra növesztik rá. A kis mérettartomány miatt ezzel az eljárással jól tanulmányozható egy kisebb sejtpopuláció vagy akár egyetlen sejt viselkedése is. A módszer egyik hátránya éppen újszerűsége, mivel egyetlen, USA-beli cég gyárt olyan készüléket, amely a mérés kivitelezésére alkalmas. A műszer beszerzési ára igen magas, ezért saját műszer fejlesztése indokolt.

A kifejlesztendő műszer feladata összetett: egyrészt regisztrálnia kell a mért impedanciát, másrészt az impedancia értékét az irodalom nem csak egy frekvencián tárgyalja, így szükséges lehet különféle, esetleg egy időben több frekvencián méréseket végezni. A felmerülő méréstechnikai és jelfeldolgozási feladatok indokolják, hogy a mérőrendszer jelfeldolgozó processzort (DSP) tartalmazzon. A DSP-vel felépített mérőrendszerben lehetőség nyílik arra, hogy a rendszer maga generálja a méréshez szükséges gerjesztőjelet is, lehetővé téve a szinkronizált mérést. A mérés végrehajtására jól alkalmazható a periodikus jelek analíziséhez kifejlesztett ún. rezonátoros megfigyelő.

Konkrét feladatok:

1. Az irodalom alapján adjon áttekintést a sejtréteg-permeabilitás sejtleletani jelentőségéről, illetve méréséről! Mutassa be és elemezze az irodalomban leírt impedanciamodelleket!
2. Tervezzon a rezonátoros megfigyelőn alapuló mérési eljárást sejtréteg transzcelluláris impedanciájának mérésére! Specifikálja a megvalósítandó mérési funkciókat, részletezve a lehetséges mérési frekvenciákat, az elérhető mérési pontosságot, valamint az adatok rögzítésének lehetséges mintavételi frekvenciáit!
3. Valósítsa meg a mérőrendszert Analog Devices ADSP-2181 EZ-KIT LITE jelfeldolgozó kártyán! A rendszer kezelői felületét MATLAB-ban készítse el!

dr. Sujbert László
docens

Nyilatkozat

Alulírott, Sántha Balázs, a Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem hallgatója kijelentem, hogy ezt a diplomatervet meg nem engedett segítség nélkül, saját magam készítettem, és a diplomatervben csak a megadott forrásokat használtam fel. Minden olyan részt, melyet szó szerint, vagy azonos értelemben, de átfogalmazva más forrásból átvettem, egyértelműen, a forrás megadásával megjelöltem.

.....
Sántha Balázs

Tartalom

1. Sejtbiológiai háttér.....	7
1.1. A sejtréteg-permeabilitás élettani jelentősége.....	7
1.2. Extracelluláris mátrix és citoskeleton.....	8
2. A sejtréteg-permeabilitás vizsgálata.....	10
2.1. Mérés jelzett anyaggal.....	10
2.2. Vizsgálat elektromos ellenállás mérésével.....	11
2.3. Az impedanciamérési technikák rövid története.....	11
2.4. Az elektród–elektrolit átmenet [1].....	14
2.4.1. A felületi kapacitás.....	14
2.4.2. A felületi rezisztív elem.....	16
2.4.3. A Warburg-impedancia.....	17
2.4.4. A szétterjedési ellenállás. Az elektród–elektrolit átmenet elektromos modellje.....	19
2.5. Electrical Cell-substrate Impedance Sensing, ECIS.....	20
2.5.1. ECIS mint sejtrétegpermeabilitás-mérési technika és készülék.....	20
2.5.2. ECIS technikával végzett kísérletek eredményei.....	23
3. A mérés elméleti alapjai.....	27
3.1. A mérés elve.....	28
3.1.1. A rezonátor bázisú generátor-megfigyelő pár [12].....	28
3.1.2. A rezonátoros megfigyelő megvalósítása.....	31
3.2. Az impedanciamérés módja.....	32
3.3. Megvalósítandó mérési funkciók.....	34
4. Megvalósítás.....	36
4.1. ADSP-2181.....	37
4.1.1. A processzor.....	37
4.1.2. A fejlesztőrendszer.....	38
4.2. A DSP program és a felhasználói felület.....	38
4.2.1. Az IT rutin.....	39
4.2.2. A MATLAB program.....	42
4.3. Az elektróda-befogadó egység.....	43
5. Eredmények.....	45
5.1. Mérések fix alkatrészekon.....	45
5.2. Mérések csapvízen és sejtenyésző médiumon.....	49
5.3. Mérések sejtrétegen.....	52
6. Összefoglalás.....	55
Köszönetnyilvánítás.....	57
Irodalomjegyzék.....	58

Összefoglaló

A sejtleletani (in vitro), valamint a keringési és kardio-vaszkuláris (in vivo) kutatásokban a barrier funkció jellemzéséhez leggyakrabban használt mérési adat a vizsgált sejtréteg vagy érfal áteresztőképességének (permeabilitásának) a mértéke. In vitro körülmények között, sejtenyészetekben, a permeabilitás mérésére több technikát is kidolgoztak. Egy újabb eljárás szerint a folytonos, konfluens sejtréteg villamos ellenállásának értékével jellemezhető a permeabilitás: a sejtréteg transzcelluláris ellenállásának (TER) méréséhez a sejteket kisméretű arany elektródokra növesztik rá. Egyetlen, USA-beli cég gyárt olyan készüléket (ECIS), amely a mérés kivitelezésére alkalmas.

A diplomatervezés keretében egy olyan eszköz került megvalósításra, amely kiváltja a fent említett amerikai készüléket, miközben annak elektródáját használja, egyszerre több frekvencián képes impedanciát mérni és a mért értékeket tárolni. A felmerülő méréstechnikai és jelfeldolgozási feladatok indokolták, hogy a mérőrendszer jelfeldolgozó processzort (DSP) tartalmazzon. Az Analog Devices cég AD2181-es processzorát tartalmazó ADSP 21xx EZ-KIT Lite jelfeldolgozó kártyájára épülő mérőrendszerben lehetőség nyílt arra, hogy a rendszer maga generálja a méréshez szükséges gerjesztőjelet is, lehetővé téve a szinkronizált mérést; a mérés végrehajtására a periodikus jelek analíziséhez kifejlesztett, a frekvenciatartományban működő ún. rezonátoros megfigyelő elve került felhasználásra. A biológiai mintán eső feszültség erősítéséhez a Brüel&Kjaer cég NEXUS 2693 típusú erősítője lett felhasználva. Az eszköz kezelői felülete PC-n, MATLAB alatt valósult meg: a mérés indítását, a mérés végén a DSP memóriájából a mért adatok felhozatalát, azok megjelenítését MATLAB program végzi.

Az elkészített eszköz által sejtrétegen végzett mérések eredményei azt mutatják, hogy a mérőrendszer analóg részének egyetlen kártyára integrálása, a hozzávezetések professzionálisabb megvalósítása, esetleg lebegőpontos jelfeldolgozó processzor alkalmazása a mérések megbízhatóbbá tételéhez a későbbiekben indokolt lehet.

A diplomaterv kapcsán bemutatásra kerültek a különböző, sejtréteg-permeabilitás mérésére szolgáló módszerek, valamint az elektród-elektrolit határfelület elektromos modellje is.

Abstract

The most frequently used parameter to describe the barrier function in cell physiology (in vitro) and cardiac-vascular system (in vivo) research is the permeability of the cell layer or the wall of blood vessels. There are different methods for „in vitro” environment to measure the permeability in cell cultures. One of the new procedures says that measuring the electric resistance of the confluent cell layers is usable to determine the permeability. In this case the cells are grown on a little gold plate electrode to measure the transcellular electrical resistance (TER). There is only one company (in the USA) producing such instruments (ECIS) which is suitable to measure TER.

Within the scope of this thesis a device has been developed that uses the electrode of the American instrument and is able to measure impedance in several frequency at the same time and store the measured data. The tasks of measurements and signal processing made necessary to build a digital signal processor (DSP) in the equipment. The device contains an ADSP 2181 based EZ-KIT Lite development board able to excite the electrode so the synchronized measurement becomes possible. The measurement is done via the resonator-based generator–observer pair that works in the frequency domain and has been developed for analysing periodic signals. An amplifier of Brüel&Kjaer amplifies the voltage falling the biological sample. On-line measurement tasks (i.e. excitation generation, operation of the resonator-based observer, averaging and storing the raw data) are done on the DSP, while the user interface and the high-level calculations are running in MATLAB.

The experiences from the measurements carried out on cell layers with the device show that further developments – integrating the analog part into a single card, careful and professional design of the electrode cabling would be essential in further development. Using a floating-point signal processor could increase the measurement accuracy and reliability, as well.

Various methods for the measurement of permeability of cell layers and the electrical model of electrode–electrolyte surface are presented, as well.

1. Sejtbiológiai háttér

1.1. A sejtréteg-permeabilitás élettani jelentősége

Az élő szervezetek sejtjei sohasem önmagukban léteznek, mindig kapcsolódnak egymáshoz, ezáltal létrehozva a szervek különböző funkcionális elemeit. Vannak olyan sejttípusok, amelyek sejtréteget képezve határoló funkciót töltenek be, elválasztanak szerveket egymástól vagy a külvilágtól. Példaként gondoljunk csak bőrünk külső sejtrétegére, a hámsejtek (ún. epithelsejtek) által alkotott, szoros illeszkedésű sejtrétegre, mely számos feladatot ellát: ellenáll a legkülönbözőbb fizikai és vegyi hatásoknak, jelentékeny mechanikai védő és hőszigetelő funkciót tölt be, jelentős zsírtartalma vízhatlanná teszi a bőrt és megvédi a kiszáradástól a mélyebb rétegeket, valamint a kórokozó mikroorganizmusok szervezetbe való bejutásának legfőbb gátjaként funkcionál.

A gerinces érrendszer verőerekből (artériák), visszerekből (vénák) és a közöttük található hajszálerekből áll. A három szakasz erei különböző szerkezetűek. Közös vonásuk, hogy mindháromnak a falát belülről egy speciális hámréteg, az endothelsejtek rétege alkotja. A hajszálerek fala sokhelyütt egyetlen endothelréteg, kívülről alaphártyával borítva, ezen keresztül megy végbe a tápanyagok és az oxigén leadása az interstíciumba (sejtközötti állomány) ill. a bomlástermékek és a szén-dioxid visszavétele az interstíciumból az érrendszerbe.

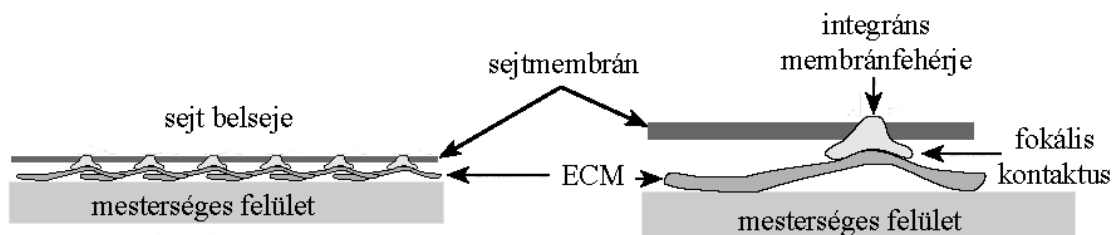
Az erek belső falát borító folytonos endothelsejt-réteg az egyik fő szabályozója annak a gát (barrier) funkciónak, amely ellenőrzi a szövetek és a keringő vér között, az érfalon keresztül történő anyagforgalmat. A barrier funkció megváltozása, csökkenése az endothelium átteresztőképességének (permeabilitásának) megnövekedéséhez vezethet, aminek következtében fokozódik a keringő folyadék és a benne oldott anyagok kijutása az érből. Ennek az állapotnak az eredménye szöveti ödéma (vizenyő), amely végső soron szervi funkció csökkenést is eredményezhet. Az endothelium átteresztőképességét több gyulladást közvetítő anyag (ún. mediátor) is képes megnövelni, pl. hisztamin, bradikinin, citokinek, reaktív oxigén gyökök, valamint különböző növekedési faktorok. Ezen mediátorok fokozott felszabadulását leírták gyulladással járó állapotokban, szepszisben, diabéteszben (cukorbetegség), valamint magas vérnyomás és atheroszklerózis (érelmeszesedés) kialakulása során.

Az endothelium átteresztőképességének csökkenése, a sejt-sejt kapcsolatok: az ún. tight junctionök fellazulása fontos szerepet játszik a metasztázisban, azaz a rákos áttétek képződésében. Ennek során a keringésbe kerülő rákos sejtek kitapadnak az endothel sejtréteg felszínén, különböző növekedési faktorokat termelnek, amelyek hatására a zárt endothel sejt-sejt kapcsolatok fellazulnak, és a rákos sejt kijuthat a keringésből a sejtközötti állományba, újabb rákos sejtsomót, áttétet létrehozva.

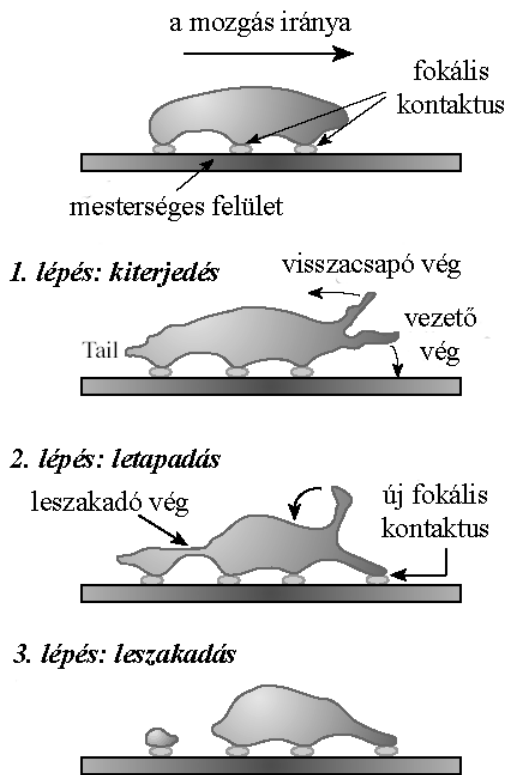
1.2. Extracelluláris mátrix és citoszkeleton

Minden sejt membránját körülvesz egy hálószerű szövet, melyet különböző molekulák (kollagén fehérjék, poliszacharid-fehérje komplexek, glikoproteinek) alkotnak: az ún. extracelluláris mátrix (ECM). Ez az a háló, ami *in vivo* körülmények között (az élő szervezetben) kapcsolatot létesít a sejtek között, és ugyanez, ami *in vitro* (a gazdaszervezetről kiszakítva, laboratóriumi körülmények között) biztosítja a sejtek letapadását a különböző mesterséges felületekre, így befolyásolja a sejtek alakját (a sejtek oldatban gömb alakúak, míg sík felületre letapadva laposak), sőt, különböző élettani folyamatait is (mint pl. növekedés, mozgás, esetleg sejthalál okozása). Az extracelluláris mátrix építőelemeit *in vitro* körülmények között sok esetben a sejttenyésztő oldat, az ún. médium tartalmazza [1].

A sejtmembrán integráns fehérjéinek egy típusa (integrin receptorok) képes felismerni az extracelluláris mátrix bizonyos összetevőit és kapcsolódni hozzájuk. Ezeket a kapcsolódási pontokat fokális kontaktusoknak nevezzük (1. ábra).



1. ábra. A sejtek tapadása a mesterséges felületre a fokális kontaktusokon keresztül [1]



2. ábra. A sejtek mozgása [1]

A fokális kontaktusok mérete (kb. 1 μm átmérőjűek) elenyésző a sejt teljes bazális felületéhez képest, így a sejtek és a mátrix (ill. a mesterséges felület) között nincs szoros kapcsolat, hanem egy laza szerkezetű (hálózatszerű) tér található. A sejtek mozgása – melyet a sejt fehérjerostok (alapvetően aktin filamentumok) polimerizációjával és depolimerizációjával visz végbe – a fokális kontaktusok mint tapadási pontok segítségével történik: a 2. ábrán látható ciklus ismétlődik mindaddig, amíg a sejtet mozgásra ingerlő kémiai, fizikai vagy más környezeti inger éri [1].

Az endothel sejtréteg kialakulása is sejtmozgás következménye, de sejtmozgás játszódik le sok más sejtleletani folyamatban, pl. a rákos sejtek metasztatikus viselkedése során.

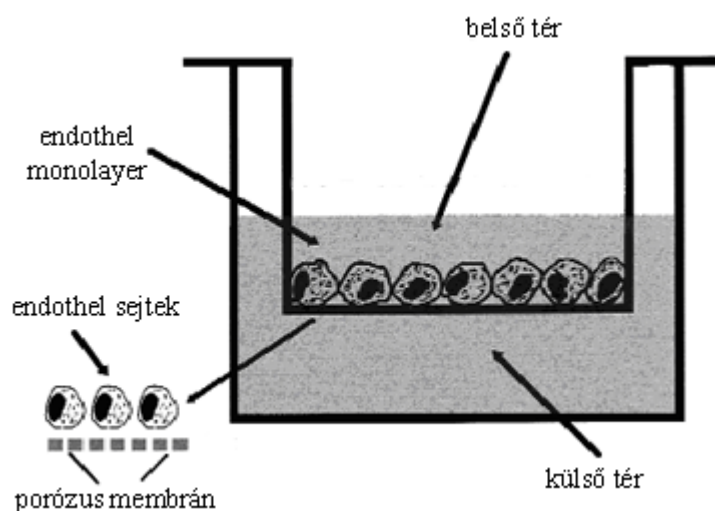
Az endothel sejtréteg permeabilitását jelentősen befolyásolja a sejtek alakja, amely két erő eredőjének az eredménye. A sejtseleken elhelyezkedő sejt felszíni adhéziós molekulák (pl. cadherine), akár a sátorcövek, kifeszítik a sejtet. Ezzel szemben hat az aktin citoskeleton (sejtváz) összehúzó, kontraktilis ereje, azaz az aktin citoskeleton átrendeződése a sejtmozgás mellett a sejtalakot is befolyásolja. Az aktin filamentumok fokozott polimerizációja miatt megnövekszik a kontraktilitás, és ennek eredményeképpen fellazul a sejt-sejt kapcsolat, a sejtek között lyukak jelennek meg. Ez a folyamat növelheti a sejtréteg permeabilitását.

2. A sejtréteg-permeabilitás vizsgálata

Az endothelsejtek működésének megismerésére, az endothelium integritásának jellemzésére a leggyakrabban használt módszer az endotheliális átteresztőképesség mérése, amelyre az utóbbi években több metodikát is kidolgoztak. In vitro körülmények között, sejttenyészetben, a mérést 100%-ig folytonos, összefüggő, azaz konfluens endothelsejtrétegen végzik.

2.1. Mérés jelzett anyaggal

Az endothelsejtréteget vizsgálhatják jelzett anyag segítségével, ekkor a vizsgálatokhoz ún. módosított Ussing-kamrát használnak (lásd 3. ábra), a sejteket a belső kamra alján található porózus membránra növesztik, amíg a sejtréteg el nem éri a konfluens állapotot. A sejteket a sejttenyésztő oldat, a médium veszi körül, amely a sejtek életben maradásához szükséges tápanyagokat és vitaminokat tartalmazza, melyek nagyobb szerves molekulák és kisebb ionok. A sejtréteg konfluenssé válásával létrejön egy belső, illetve egy külső tér, amely a porózus membránon és az arra ránövesztett „endothelsejt-egyrétegen”, ún. endothel monolayeren keresztül érintkezik egymással. A permeabilitás-változás vizsgálatára többnyire ismert molekulaméretű, jelzett anyagot (fluoreszcens festék, radioaktív izotóp, stb.) használnak, mely a porózus membránon keresztül gond nélkül közlekedik. Az endothel monolayer permeabilitásának változása a jelzett anyag átjutásának nyomon követésével, mérésével határozható meg.



3. ábra. A módosított Ussing-kamra vázlatja a membránra növesztett endothelsejtekkel

Ez a kísérleti elrendezés az endotheliális permeabilitás rövid távú vizsgálataira jól alkalmazható, de megvannak a korlátai. A módszer hátránya, hogy a megfelelő érzékenységgű mérés végrehajtásához a porózus membrán területének nagy részén a endothelsejtréteg konfluens kell legyen, ami még a sejtek számára ideális körülmények között is nehezen kivitelezhető, tekintve a relatív nagy porózus felületet (cm²-es nagyságrend). Ebből következően a finom változásokat nehezebb nyomon követni, a hosszabb időtartamú vizsgálatok eredményeit pedig nagyban befolyásolhatja a diffúzió, és a jelzett anyag felhalmozódása miatt nem lehet kimutatni a reverzibilis változásokat.

2.2. Vizsgálat elektromos ellenállás mérésével

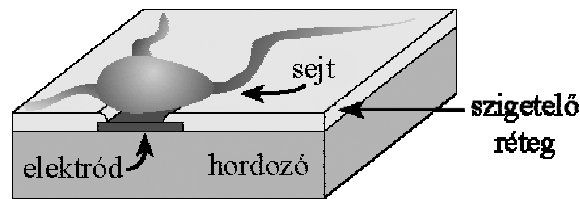
Az endothel funkció változása mellett a monolayer strukturájának, szerkezetének átrendeződését is vizsgálhatjuk a transzendotheliális elektromos ellenállás (TEER, Trans-Endothelial Electrical Resistance) mérésével. A kísérleti elrendezés a 3. ábrán láthatóhoz hasonló, a monolayer két oldalán levő médiumban (mely tökéletes elektrolit: töltéssel rendelkező részecskéket tartalmaz) egy-egy elektród helyezkedik el, az elektromos áramnak így az endothel monolayeren kell keresztülfolynia, s mivel a sejtmembrán jó szigetelőként viselkedik a sejteket körülvevő médiumhoz képest, a sejtek között kialakuló rések csökkentik a sejtréteg ohmos ellenállását. Ennek a módszernek ugyanaz a problémája, mint a 2.1. pontban leírtak: a relatív nagy porózus felület egészét nehéz benővesztetni sejtekkel. Ez jelentős mérési pontatlanságot okozhat, a mérés reprodukálhatósága pedig lecsökken.

Ezen gyenge pontokat képes kiküszöbölni az a módszer (ECIS, Electric Cell-substrate Impedance Sensing), amely során maga az extracelluláris mátrixszal bevont elektród az a felület, amelyen az endothelsejtek nőnek.

2.3. Az impedanciamérési technikák rövid története

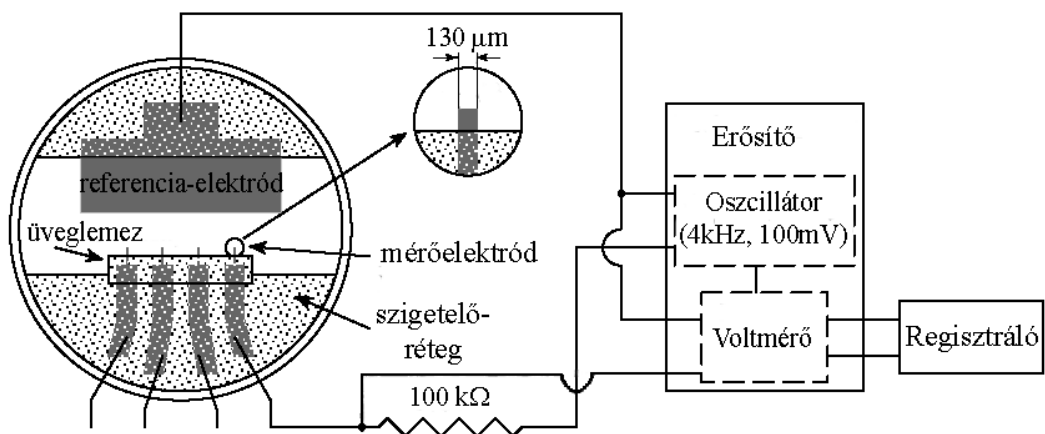
Két kutatócsoport (Giaever és Connolly vezetésével) párhuzamosan kezdett el az 1980-as években foglalkozni az in vitro tenyésztett sejtek impedanciaméréssel kivitelezett vizsgálatával. Rájöttek, hogy ha egy sík (üveg, műanyag vagy szilikon) hordozó lemezre fém (arany, platina, indium-ón-oxid vagy irídium) vékonyréteget párologtatnak, majd az egész síklapot bevonják valamilyen jól szigetelő anyaggal (poliimid, szilikon-dioxid, szilikon-nitrid stb.) a kívánt méretű és alakú aktív elektród-

felületeket kivéve, azzal – az elektród aktív felületének nagyságától függően – jól vizsgálható egyetlen sejt vagy sejtcsoport (4. ábra).



4. ábra. Sík elektród-elrendezés egyetlen sejt vizsgálatára

Giaever és Keese voltak az elsők, akik 20..80 sejtből álló populációt vizsgáltak. Polisztrénből készült hordozón egy nagyobb (2 cm^2 területű) referencia-elektrodot és 4 kisebb ($3 \cdot 10^{-4}\text{ cm}^2$ területű) mérőelektrodot hoztak létre aranyból, az 5. ábrán látható elrendezésben. A hordozó egy kis sejtenyésző cella alsó lapját képezte, a cellában emberi tüdő eredetű fibroblast sejteket tenyésztettek, s egy $100\text{ k}\Omega$ -os ellenálláson keresztül 100 mV amplitúdójú, 4 kHz -es szinuszzel gerjesztették az elektródákat. Ez közel konstans áramot eredményezett (mivel a mérő- és a referencia-elektrod közötti változó impedancia csupán pár $\text{k}\Omega$), s így a fibroblast sejtréteg impedanciája arányos volt az elektródok között eső feszültséggel, amit regisztráltak. Ez volt az első olyan kísérlet, ahol sejtek szaporodását (impedancia-növekedés) és mozgását (impedancia-oszcilláció) *in vitro* voltak képesek megfigyelni [2].



5. ábra. Elektród és impedancia-mérő rendszer [2]

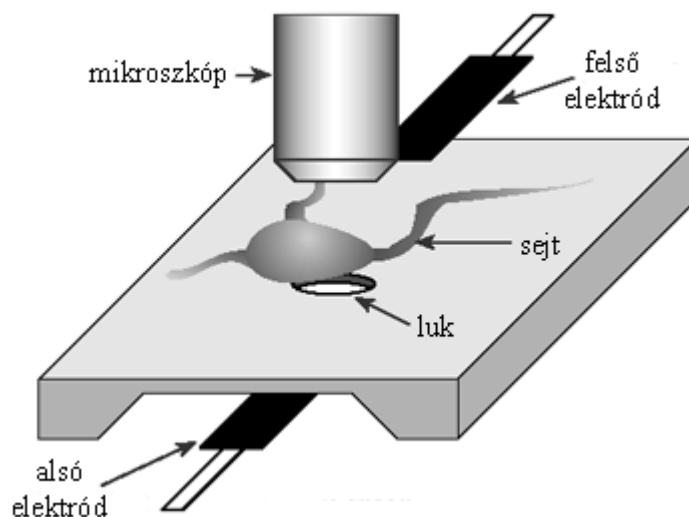
Giaever és Keese vizsgálták különböző fehérjék és más faktorok (pl. hőmérséklet, glükóz, CO_2 stb.) hatását a sejtek letapadására és mozgékonyására [3][4], s kísérleteztek olyan emberi köldökzsinórvéna endothelsejtekkel (HUVEC, Human Umbilical Vein Endothelial Cells) is, mely sejtek kutatására a jelen diplomaterv

megoldása során kifejlesztett eszköz is remélhetőleg szolgálni fog. Giaeverék megmutatták, hogy ez a technika képes a sejtmozgás nm-es szintjének detektálására, ami eleddig elképzelhetetlen volt még time-lapse mikroszkópiával is.

Conolly és munkatársai is az 5. ábrán látható elektród-elrendezést és mérőrendszert használták, azzal a különbséggel, hogy a sejttenyésztő cellát két részre osztották egy, a médium számára átjárható cellulóz-nitrát membránnal. Az így két részre osztott cella két felében azonos elrendezésű elektródapár volt megtalálható, s míg az egyik félben tenyésztettek sejteket, addig a másik sejtmentes volt. Ez utóbbi szolgált referenciául, mivel a cella mindkét felében ugyanaz a médium volt jelen [5].

Wegener és munkatársai is a Giaeverék által használt elektródhoz hasonlóval dolgoztak, endothel és epithel monolayereken végeztek méréseket az 1 Hz-től 10 kHz-ig terjedő frekvenciatartományban. Eredményeik konzisztensek Giaeverék eredményeivel [6].

Egyetlen sejt mozgásának vizsgálatára vállalkoztak Hagedorn és munkatársai. Egy szilikon membránra a vizsgált sejt átmérőjének nagyságrendjébe eső átmérőjű (10 μm) lyukat perforáltak, s a membrán mindkét oldalán elhelyeztek egy-egy platina elektródot (6. ábra). Hagedorn konklúziója az volt, hogy ez az elrendezés sokkal érzékenyebb a sejtmozgás detektálására, mint a Giaever-féle, ami nem csoda, hiszen Giaeverék sejtpopulációt vizsgáltak, ahol az egyes sejtek mozgása egymással ellenkező előjelű részimpedancia-változásokat is okozhatott [7].



6. ábra. Egy sejt mozgásának detektálására szolgáló elrendezés [7]

2.4. Az elektród–elektrolit átmenet [1]

2.4.1. A felületi kapacitás

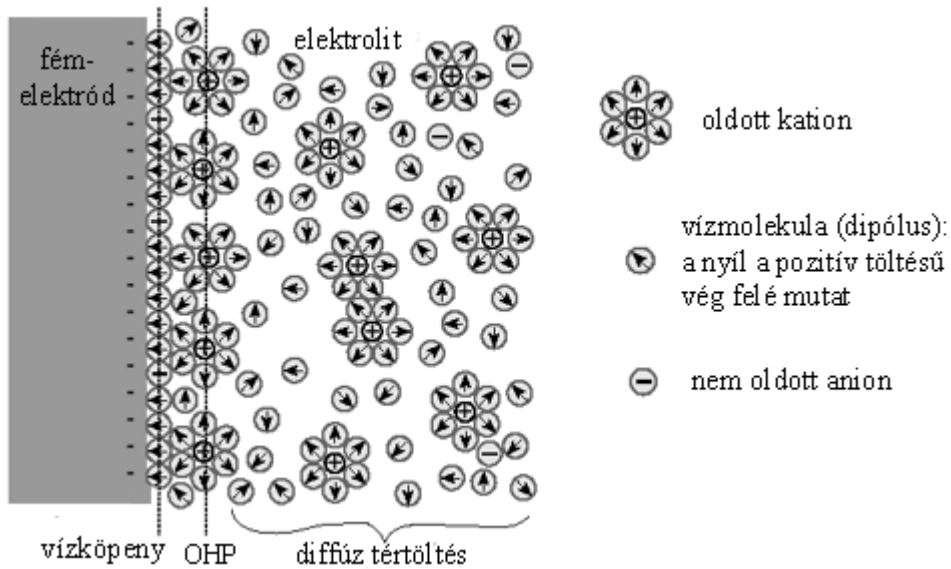
Ha bármely fém elektródot ionokat tartalmazó elektrolitba mártunk, elektrokémiai egyensúly jön létre. Közvetlenül az elektrolitba mártás után kémiai reakció indul meg: elektron-transzfer az elektród és elektrolit között az elektród anyagától függő irányban. Ez elektromos mezőt indukál, ami korlátozza a kémiai reakciót (ha a kémiai reakció hatására redukció ment végbe, akkor a kialakuló elektromos mező oxidációt indukál és fordítva), végül beáll egy egyensúly, amikor már összességében áram nem folyik.

Az elektród felületén azonban potenciálkülönbség alakul ki, ezt hívjuk fél-cella potenciálnak (V_0). A példa kedvéért vegyük azt az esetet, amikor az elektród redukálódik az elektrolitba merítés hatására. Ekkor a vízmolekulák, mint kis dipólusok, a pozitív töltésű végükkel körülölelik az elektródot: ún. vízköpenyt alkotnak (7. ábra). Közvetlenül a vízköpeny mögött azok a vízben oldott pozitív ionok sorakoznak rétegbe rendeződve, amelyek az elektród redukciója következtében elveszítették elektronjukat. Ezek alkotják az ún. külső Helmholtz-síkot (OHP, Outer Helmholtz Plane). Így egy elektromos kettős réteg keletkezik az elektród-elektrolit határfelületen: a negatív töltésű réteg a fémelektrod felszíne, a pozitív töltésű réteg az OHP, míg a vízköpeny dielektrikumnak tekinthető [1]. Ez pedig nem más, mint egy síkkondenzátor modellje, melynek kapacitása a Helmholtz-kapacitás:

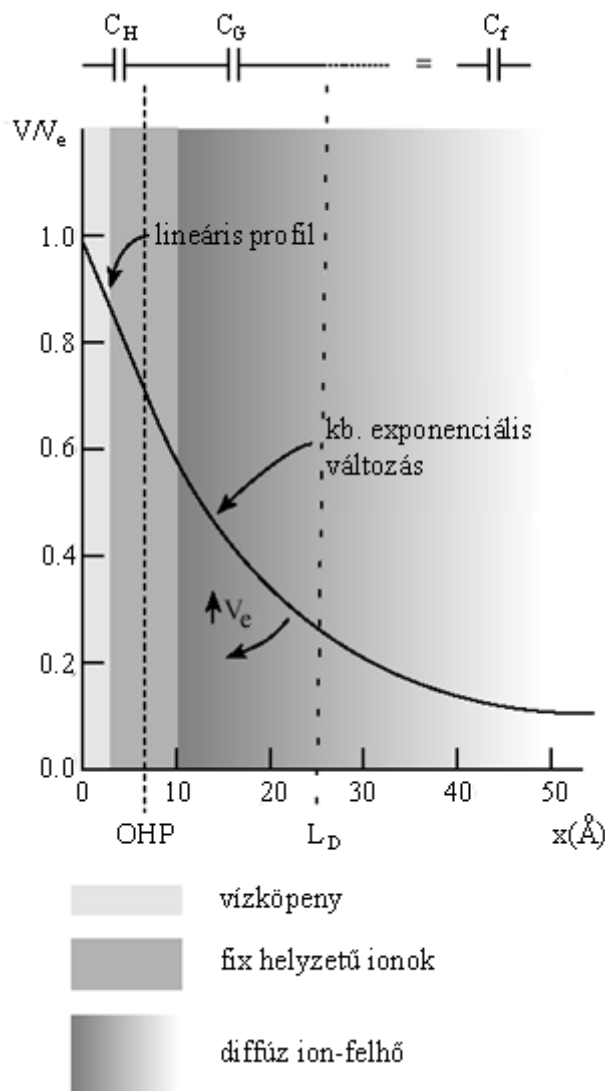
$$C_H = \frac{\varepsilon_0 \varepsilon_r}{d_{OHP}} \quad (1)$$

ahol C_H az egységnyi területre jutó kapacitás (F/m^2), ε_0 a vákuum dielektromos állandója ($8.85419 \cdot 10^{-12} F/m$), ε_r az elektrolit relatív dielektromos állandója, d_{OHP} pedig a külső Helmholtz-sík (OHP) távolsága a fém-elektrod felszínétől.

A rögzített külső Helmholtz-síkot körülvevé kialakul azonban egy szabadon mozgó ion-felhő is (a 7. ábrán a diffúz tértöltés tartománya), melyre a már említett elektromos tér, de termikus erők is hatással vannak. Azaz az elektród közelében kialakuló tértöltés az OHP-ben koncentrálódik, majd az elektródtól távolodva folyamatosan, exponenciálisan csökken (8. ábra).



7. ábra. Az elektród–elektrolit átmenet sematikus ábrázolása [1]



8. ábra. Az elektród–elektrolit átmenet [1]

Az ion-felhő által létrehozott kapacitást Gouy után Gouy-kapacitásnak nevezzük, értéke:

$$C_G = \frac{\epsilon_0 \epsilon_r}{L_D} \cosh\left(\frac{zV_e}{2V_t}\right) \quad (2)$$

ahol C_G az egységnyi területre jutó kapacitás (F/m^2), z az ionok vegyértéke, V_e az elektród potenciálja és V_t a termikus feszültség ($V_t = \frac{kT}{q}$, ahol q az elektron töltése), L_D a Debye-távolság:

$$L_D = \sqrt{\frac{\epsilon_0 \epsilon_r V_t}{2nz^2 q}} \quad (3)$$

ahol n az ionok koncentrációja az elektrolitban (ion/liter). A Debye-távolság állandónak tekinthető állandó hőmérsékleten állandó ionkoncentráció mellett, így (2)

miatt a Gouy-kapacitás csak az elektród potenciáljától függ.

Az elektród-elektrolit határfelületen kialakuló eredő kapacitást (C_f) akkor kapjuk meg, ha a Helmholtz- és a Gouy-kapacitást sorba kapcsoljuk (8. ábra):

$$\frac{1}{C_f} = \frac{1}{C_H} + \frac{1}{C_G} \quad (4)$$

Jelen dolgozat szempontjából az az eset érdekes, amikor impedanciamérés céljából feszültséget kapcsolunk az elektródákra, azaz V_e értéke a nyugalmi egyensúlyi potenciálhoz képest megnő. Ennek következtében a Gouy-kapacitás értéke a V_e -től független Helmholtz kapacitás többszörösévé válik, az eredő képben így a Helmholtz kapacitás fog dominálni és az eredő felületi kapacitás (C_f) elég nagy gerjesztőfeszültségnél alulról megközelíti C_H -t (a Helmholtz kapacitásra egy kísérleti „worst case” érték: $0.14 \mu\text{F}/\text{mm}^2$).

2.4.2. A felületi rezisztív elem

Ha egyenfeszültséget kapcsolunk két, elektrolitba mártott elektród közé, áram kezd el folyni. Ez pedig azt jelenti, hogy az előző fejezetben leírt felületi kapacitással párhuzamosan kapcsolva rezisztív elemnek kell lennie az elektród-elektrolit átmenet elektromos modelljében.

Ha feszültséget kapcsolunk az elektródra, akkor az polarizálódik, s ún. polarizációs túlfeszültség (V_p) keletkezik, ami definíció szerint az elektród felületén eső feszültség és az elektród fél-cella potenciáljának különbsége. Ez több összetevőből adódik össze:

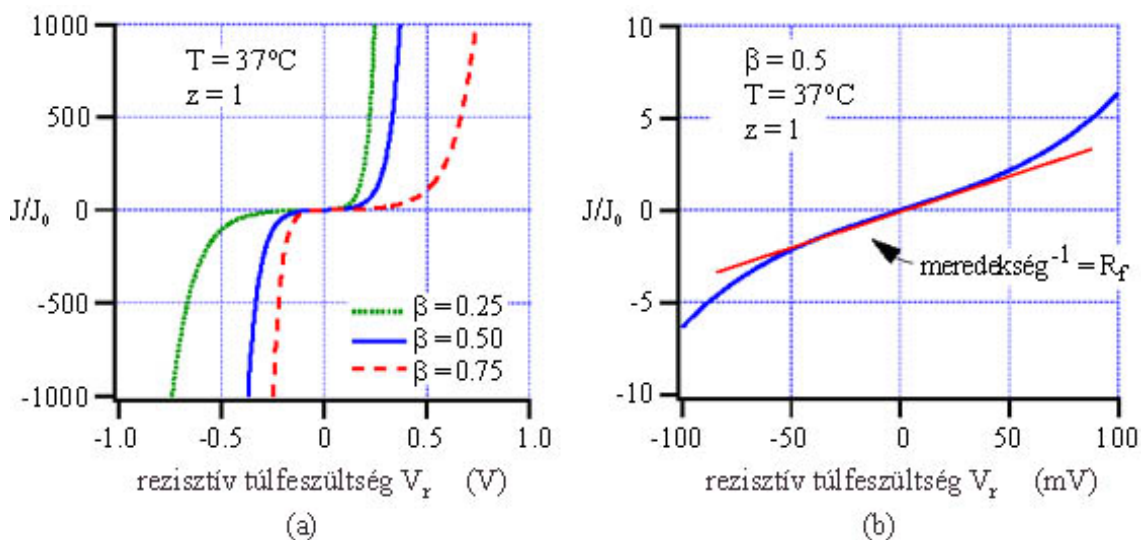
$$V_p = V_r + V_k + V_a \quad (5)$$

ahol V_r az elektromos kettős rétegnek köszönhető rezisztív túlfeszültség, ami a redukció vagy az oxidáció korlátozott sebessége miatt alakul ki; V_k az (ion)koncentrációs túlfeszültség, amit az ionok elektrolitbeli korlátozott sebességű diffúziója okoz; V_a pedig az elektrolit ionjainak kiválásához ill. az elektród anyagának oldódásához szükséges aktivációs energiaszintek megváltozásából ered [15].

Ha az elektródára kapcsolt feszültség kevéssé viszi el az egyensúlyi állapottól (pl. egy pár mV-os gerjesztés), akkor a fenti polarizációs túlfeszültség összetevők közül a rezisztív túlfeszültség dominál, a többit elhanyagolhatjuk. Ebben az esetben a Butler–Volmer-formula alapján az elektródon folyó áramsűrűség:

$$J = J_0 \left[e^{\left(\frac{(1-\beta)zV_r}{V_t} \right)} - e^{\left(\frac{-\beta zV_r}{V_t} \right)} \right] \quad (6)$$

ahol J_0 az egyensúlyi helyzetben egymást kiejtő oxidációs ill. redukciós áramsűrűség abszolút értéke, z az adott ion vegyértéke, és β a szimmetria-tényező, ami az oxidáció-redukció energia-gátbeli különbségét jellemzi.



9. ábra. A Butler–Volmer-formula alapján kalkulált áram [1]

A felületi kapacitással párhuzamos ellenállás elméleti értékének meghatározásához vegyük szemügyre a (6) szerinti J - V_r összefüggést a 9. ábrán. Az ábra (b) részén ki van nagyítva az (a) ábra $\beta = 0.5$ -re érvényes görbéjének középső, kis rezisztív túlfeszültségre ($V_r < 50\text{mV}$) vonatkozó része. Jelen dolgozat szempontjából ez a tartomány érdekes, ami jó közelítéssel lineárisnak becsülhető, itt az ohmos ellenállás értéke:

$$R_f = \frac{V_t}{J_0 z} \quad (7)$$

J_0 kísérleti értéke arany elektród esetében $4 \cdot 10^{-8} \text{ A/mm}^2$, platina elektródnál közel $8 \cdot 10^{-6} \text{ A/mm}^2$, irídium elektródnál $2 \cdot 10^{-6} \text{ A/mm}^2$.

2.4.3. A Warburg-impedancia

A legtöbb esetben valóban csupán a rezisztív túlfeszültség határozza meg az elektród–elektrolit impedancia rezisztív komponensét. Abban az esetben azonban, ha az áramsűrűség olyan nagy, hogy az ionok az elektrolitban nem képesek a lehetséges

áramsűrűség által diktált tempóban közlekedni az elektróda felé és attól el, megjelenik a koncentrációs túlfeszültség (V_k) hatása is. Az ezáltal létrejövő impedancia az elektród–elektrolit határfelület elektromos modelljében sorosan kell kapcsolódjon az előző fejezetben leírt felületi ellenállással (R_f), lévén ez a valóságban is soros folyamat: ionok diffundálnak a határfelület felé, ahol aztán részt vesznek az elektród oxidációjának vagy redukációjának folyamatában.

Warburg 1899-ben egy azóta is használt modellt ajánlott a szinuszos gerjesztés hatására, az ionok diffúziója miatt kialakuló impedancia frekvencia-függésének meghatározásához:

$$|Z_w| = \frac{k}{\sqrt{f}} \quad (8)$$

ahol k a az elektrolitra jellemző konstans, f pedig a gerjesztő szinuszjel frekvenciája. A Warburg-impedancia elemeit elméleti úton meghatározták:

$$R_w = \frac{10^3 V_t}{z^2 q n \sqrt{\pi f D}} \quad (9)$$

$$C_w = \frac{1}{2\pi R_w} \quad (10)$$

$$Z_w = \left[\frac{1}{R_w} + j2\pi C_w \right]^{-1} \quad (11)$$

ahol f a frekvencia Hz-ben, D a jelenlevő ion diffúziós állandója (1 ion jelenlétét feltételezi a modell). (10)-et (11)-be helyettesítve:

$$|Z_w| = \sqrt{2} R_w \quad (12)$$

$$\text{arc}(Z_w) = -45^\circ \quad (13)$$

A (8)-(13) egyenletek arra az esetre igazak, ha az elektródot váltakozó feszültséggel gerjesztjük, de kevésbé visszük el az egyensúlyi potenciáltól.

Amennyiben az oxidáció/redukció folyamata lassabb, mint az iondiffúzióé, akkor a rezisztív túlfeszültségből eredő felületi ellenállás lesz a domináns, ekkor az impedancia ω^{-1} -nel arányos (az R_f -fel párhuzamos C_f miatt), ha viszont az iondiffúzió a limitáló tényező, akkor $\omega^{-1/2}$ -nel. Ha fehérjék vannak az elektrolitban jelen, akkor általában az oxidáció/redukció folyamata a korlátozó tényező, mivel a fehérje hajlamos adszorbeálódni az elektród felületére (pl. ECM, lásd 1.2. fejezet), ezáltal csökkentve az

aktív elektród-felületet, így orvosbiológiai alkalmazásokban azt várjuk, hogy az elektród–elektrolit átmenet impedanciája ω^{-1} -nel lesz arányos.

2.4.4. A szétterjedési ellenállás. Az elektród–elektrolit átmenet elektromos modellje

Az elektród–elektrolit átmenet modelljének utolsó eleme a szétterjedési ellenállás. Ahogy a neve is mutatja, ez a kis mérőelektród felületéről a gyűjtőelektród felé elinduló áram számára az elektrolit által létrehozott ellenállást jelenti, mely az elektrolit fajlagos vezetőképességétől és az elektród felületétől függ. Számos modellt kidolgoztak különböző geometriájú sík elektródokra. Kör alakú síkelektrodra a szétterjedési ellenállás:

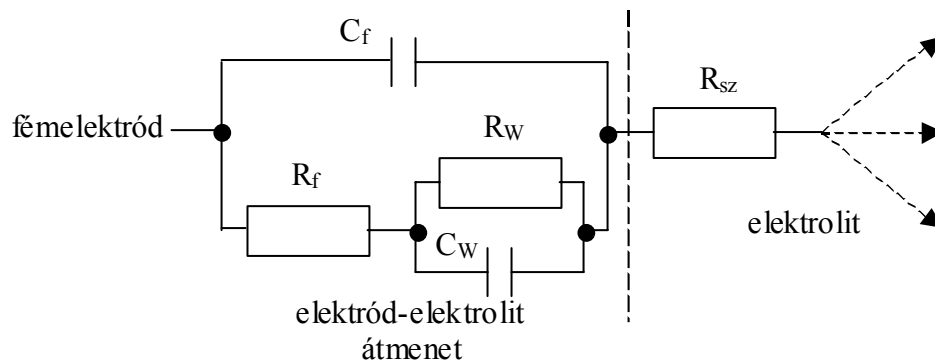
$$R_{sz} = \frac{\rho}{4r} = \frac{\rho\sqrt{\pi}}{4\sqrt{A}} \quad (14)$$

ahol ρ az elektrolit fajlagos ellenállása ($\Omega \cdot \text{mm}$), r az elektród sugara (mm), A a területe (mm^2). Téglalap alakú síkelektrodra:

$$R_{sz} = \frac{\rho \ln\left(4 \frac{l}{w}\right)}{\pi l} \quad (15)$$

ahol l a hossza, míg w a szélessége az elektródnak. (14)-ből és (15)-ből jól látszik, hogy a szétterjedési ellenállás sokkal inkább az elektród-terület négyzetgyökével arányos fordítottn, semmint első hatványával, ahogy azt az áramköri elemeknél megszokhattuk ($R = \frac{\rho L}{A}$).

Az elektród–elektrolit átmenet teljes elektromos modellje, belevéve az elektrolit hatását, a 10. ábrán látható.



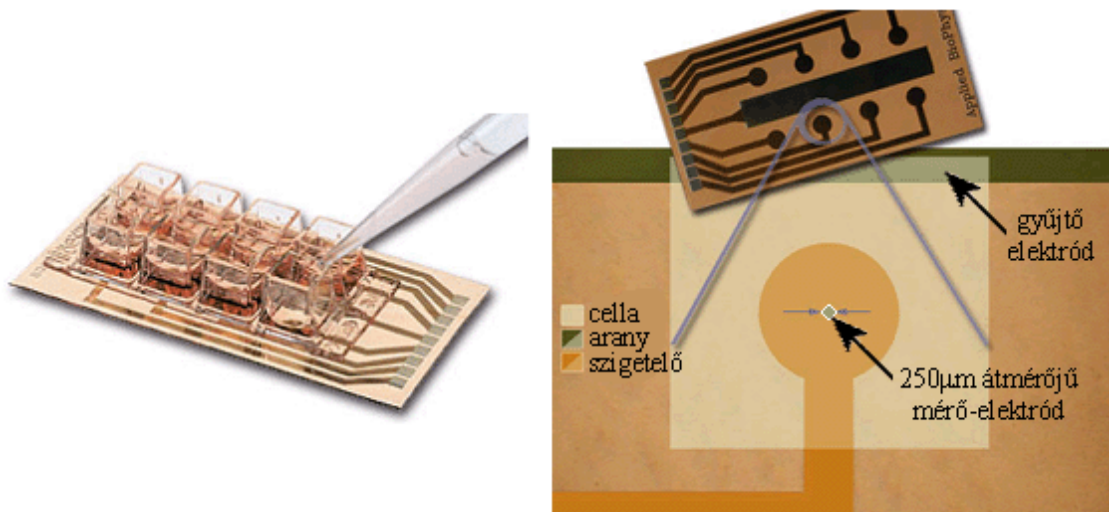
10. ábra. A tágabb értelemben vett elektród–elektrolit átmenet elektromos modellje. C_f és R_f a felületi kapacitás és ellenállás, R_W és C_W a Warburg-impedancia összetevői és R_{sz} a szétterjedési ellenállás

2.5. Electrical Cell-substrate Impedance Sensing, ECIS

2.5.1. ECIS mint sejtrétegpermeabilitás-mérési technika és készülék

A 2.3. fejezetben bemutatott kutatások alapján, de főleg Giaever és Keese eredményeire támaszkodva egy amerikai cég, az Applied BioPhysics Inc. kifejlesztett egy, a sejtpopuláció letapadásának, mozgásának és a sejt-monolayer permeabilitásváltozásának vizsgálatára alkalmas elektródelrendezést és impedanciamérő készüléket.

Az elektródelrendezés a 11. ábrán látható.

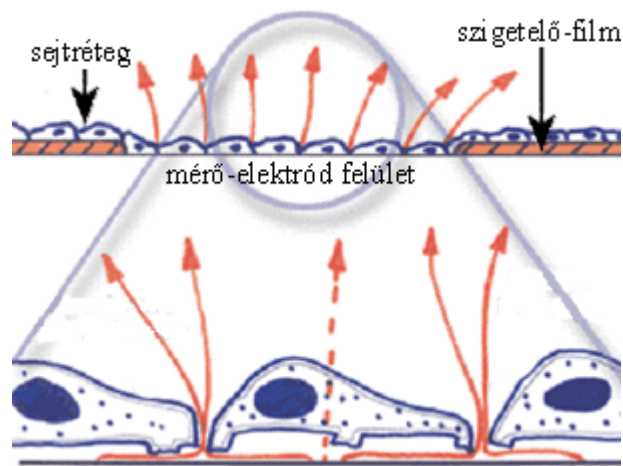


11. ábra. Az ECIS készülék elektródája [8]

Polikarbonát lapkára arany vékonyréteg van gőzölögtetve, amin szigetelő film van. A szigetelő film csak a cellák belsejében szakad meg a nagyobb méretű ($\sim 10 \text{ mm}^2$) gyűjtő-elektrodon és a kisméretű ($\sim 0.05 \text{ mm}^2$) mérőelektrodon. A lapkán 8 cellát különítettek

el (alapterületük egyenként 90 mm^2 , térfogatuk $500 \text{ }\mu\text{l}$), a gyűjtő-elektrod a lapka közepén fut, ez közös mind a 8 cellában, és minden cellának saját mérőelektrodja van. A 8 cellás elrendezés lehetővé tesz egy időben egy készülékkel 8 kísérletet [8].

Az alkalmazott áram minden cellában a mérő- és a gyűjtőelektrod között folyik. Sejtek nélkül az áram szabadon folyhat az elektrodák között, letapadt sejtréteggel a felületen az áram kénytelen a sejtréteg alatt és a sejtek között folyni a sejtmembrán szigetelő tulajdonsága miatt. Ez a tekervényes áramút nagy változást okoz a mért impedanciában. Bár ez mind a kis mérő-, mind a nagy gyűjtőelektrodon érvényes, a geometriai viszonyok miatt a mérőelektrod–sejtréteg-komplex impedanciája több százszor nagyobb, mint a gyűjtőelektrod–sejtréteg-komplexé, így a gyűjtőelektrod hozzájárulása a mért impedanciához elhanyagolható.

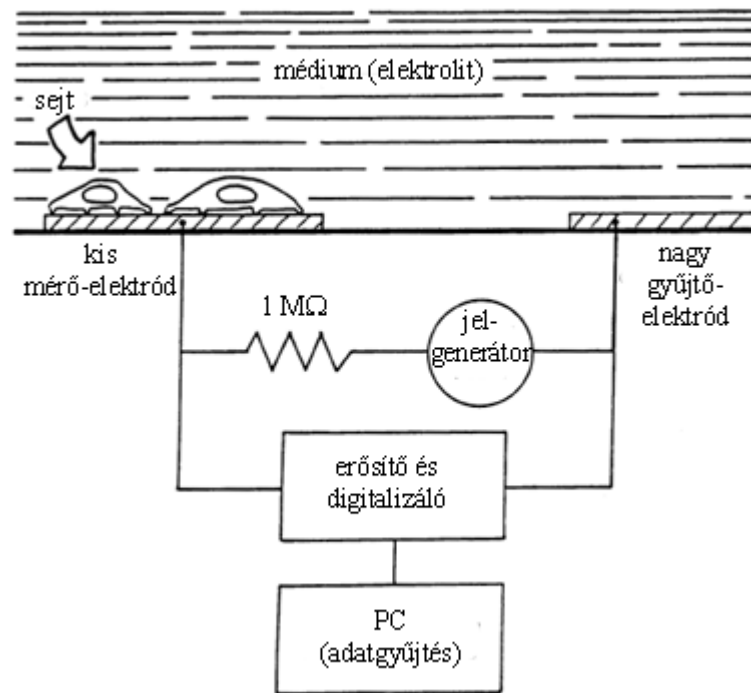


12. ábra. Sejtréteg a mérőelektrodon. Az áram a sejtmembrán szigetelő tulajdonsága miatt kénytelen a sejtek bazális felülete és a mérőelektrod felülete közötti térben a sejtek alatt és a sejtek közötti kis résekben, ill. kapacitív úton a sejteken keresztül folyni [8]

A médium ellenállása (a szétterjedési ellenállás) sorosan kapcsolódik az elektrod–sejtréteg–elektrolit átmenet impedanciájához (lásd 2.4.4. fejezet, 10. ábra) és az előbbi dominál, hacsak nem választjuk az egyik elektrod felületét kicsire. Amíg a médium ellenállása kör alakú elektrod esetén $\frac{1}{4r}$ -rel arányos (r az elektródsugár), addig az elektrod–elektrolit határfelület impedanciája az elektrod aktív felületének inverzével, $\frac{1}{r^2\pi}$ -vel. Ha r -et csökkentjük, akkor az utóbbi fog jobban nőni, ezáltal dominálni. 4kHz-en egy $0,2 \text{ mm}^2$ felületű elektrod elektrod–elektrolit impedanciájának valós része sokszor nagyobb lesz, mint a médium ellenállása. Ez az oka a mérőelektrod

kis méretének; ha két nagy elektródot használnánk, akkor a médium ellenállása lemaszkolná a mérést és így a sejtek jelenléte alig lenne detektálható [9].

A mérés váltakozó áram segítségével történik: egy szinuszgenerátor állítható frekvenciájú, 1V amplitúdójú szinuszjele 1 M Ω ellenálláson keresztül kapcsolódik a mérő- és a referenciaelektród közé (13. ábra). A két elektród között az impedancia abszolút értéke sejtek jelenléte nélkül (elektród–elektrolit átmenet sorbakötve a médiummal) pár k Ω , míg teljesen konfluens sejtréteg esetén sem haladja meg a 20 k Ω értéket. Ez a változás legalább két nagyságrenddel kisebb, mint a generátorral sorbakötött 1 M Ω -os ellenállás, azaz mondhatjuk, hogy a körben kvázi konstans, μ A nagyságrendű áram folyik. A két elektród közötti szinuszjel feszültség-amplitúdóját és fázisszögét mérve származtatható a két elektród közti komplex impedancia értéke. A sejteken átfolyó μ A nagyságrendű áram nem hoz létre detektálható hatásokat a sejtekben, a mérés noninvazívnak tekinthető.



13. ábra. ECIS mérési elrendezés [9]

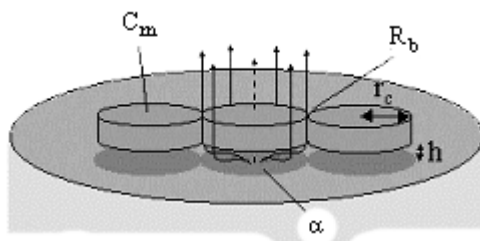
Ezzel a technikával a sejtsűrűség változását az erősen konfluens rétegtől a nagyon ritka rétegegig mérni lehet. Az elektródméret korlátozza a megfigyelhető sejtek maximális számát (pár száz darabra), de elviekben egyetlen sejt mozgása is mérhető impedanciaváltozást eredményez.

Az Applied BioPhysics készüléke ECIS fantázianéven van forgalomban, két változatban. A limitált változat 3 fix frekvencián (15, 30 vagy 45 kHz-en) tud mérni és

nem képes a komplex impedancia mérésére (csak az impedancia abszolút értéke mérhető). A teljes változatnál a mérési frekvencia 100 Hz-től 100 kHz-ig folyamatosan állítható és képes az elektróda-fedettséget is kijelezni. Az impedancia-értékek eltárolási gyakorisága mindegyik készüléken néhány minta/másodperc értéktől végtelenig állítható, a mérés az óra töredékétől napokig lehetséges. A készülékek USB-n keresztül kommunikálnak egy PC-vel, amin Windows alatt felhasználói szoftver fut, ezen keresztül történik a készülék vezérlése is [8].

2.5.2. ECIS technikával végzett kísérletek eredményei

Giaever és Keese kidolgozott egy modellt, mely az elektródára ránőtt sejtréteg elektromos tulajdonságait hivatott modellezni. A sejtort korongsorként modellezték, mely h távolságra van az elektród felületétől (14. ábra).



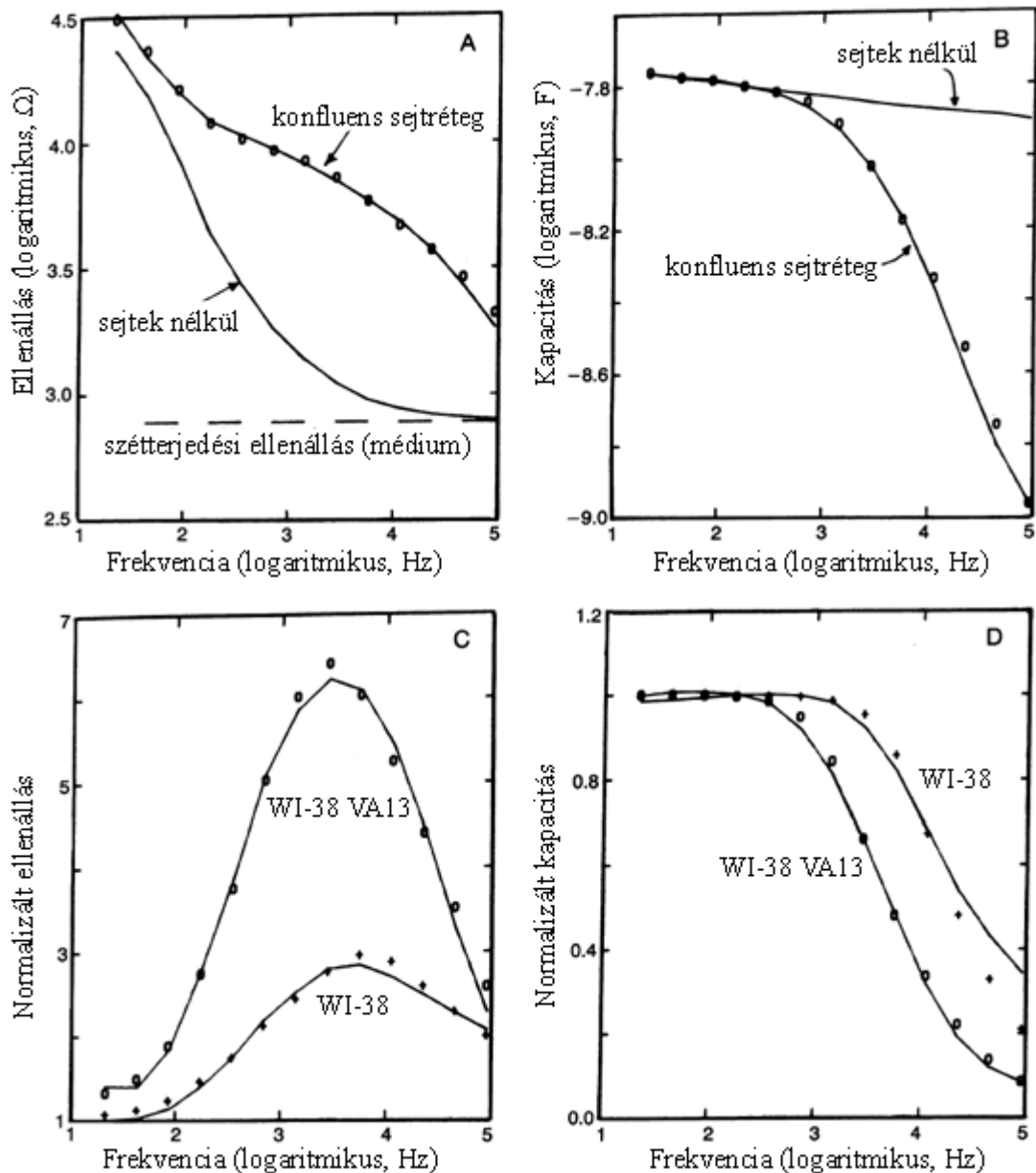
14. ábra. Sejtréteg elektromos modellje. C_m a két sorbakapcsolt sejtmembrán kapacitása, R_b a tight junctionök ellenállása, míg $\alpha = r_c \sqrt{\frac{\rho}{h}}$, ahol ρ a médium fajlagos ellenállása

függvényekkel megoldott, részletesebb ismertetésétől eltekintek. Sokkal érdekesebb az a kísérlet, amellyel megadták eme modell paramétereit, igazolták helyességét, és amely egyben iránymutatást is ad arra vonatkozóan, hogy milyen frekvenciával érdemes vizsgálni a sejt monolayer [9].

A 13. ábrán látható elrendezést használva végigszkennelték a frekvenciatartományt 22 Hz és 100 kHz között. 3 cellán végeztek méréseket: az egyikben nem voltak sejtek, csupán médium, a másik kettőben az előzővel megegyező médiumban WI-38 ill. WI-38 VA13 típusú fibroblast sejtekből konfluens monolayert növesztettek az elektródra. A két elektród között mérhető impedanciát soros RC taggal modellezve, a mért impedancia rezisztív és kapacitív összetevőjét regisztrálták. Eredményeik a 15. ábrán láthatók. Az ábrán a pontok és keresztek a modell alapján

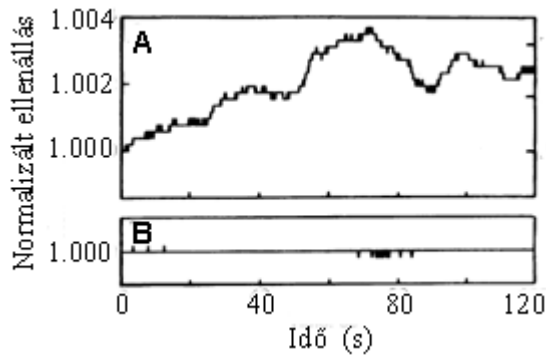
számított, míg a görbék a mért értékek; a tengelyek logaritmikus skálázásúak, a tengelyek mentén feltüntetett értékek 10 hatványkitevői; a C és a D ábrarész a sejtrétegen mért ellenállás és kapacitás-értékeket a sejt nélküli cellában mért értékekhez képest normalizálva ábrázolja [9].

A kísérleti eredményekből kitűnik, hogy a soros ellenállást tekintve a sejtréteg áteresztőképességének jellemzésére a legalkalmasabb a 4 kHz körüli frekvencián végrehajtott mérés, míg a soros kapacitás értékét mérve a 0..100 kHz-es tartományban a minél magasabb frekvenciák az előnyösesek.



15. ábra. A számított (o és +), valamint a kísérlet során mért soros impedancia-összetevők a frekvencia függvényében (az ábrák tengelyei logaritmikus skálázásúak, a feltüntetett értékek 10 hatványkitevői) [9]

A 16. ábrán 2 perces, a kezdeti értékre normalizált ellenállás-idő függvény látható, az ábra A részén kezeletlen, míg B részén formalinnal kezelt WI-38 VA13

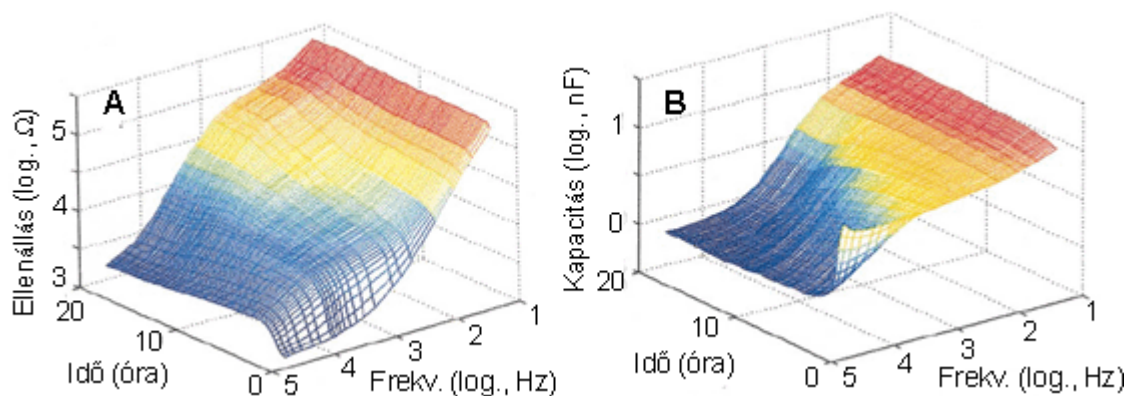


típusú sejtek konfluens monolayer-én végzett 4 kHz-es mérésről. Mivel a sejtréteg konfluens, az ellenállásingadozás nem lehetett a sejtszám-változás, sokkal inkább α és R_b változásának következménye, melyek változása körülbelül egyenlő jelentőségű lehet. A kísérlet a módszer jó érzékenységét bizonyította: viszonylag nagy

16. ábra. Kezeletlen (A) és formalinnal kezelt (B) sejt-monolayer ellenállása [9]

impedanciaváltozások tapasztalhatók (melyek nem lehetnek elektronikus zaj következménye: lásd B ábrarész), miközben mikroszkóppal nem látszik változás [9].

Egy későbbi kutatás során [10] epithelsejtek letapadását és a sejtréteg konfluenssé válását vizsgálták az idő- és frekvenciatartományban szimultán. A kísérlet eredményét jól demonstrálja a 17. ábra.

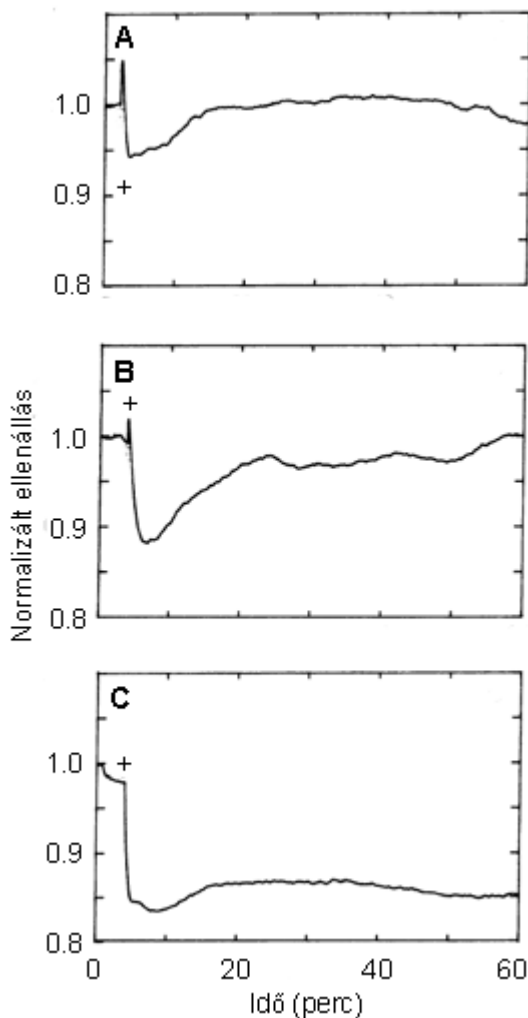


17. ábra. A soros ellenállás és kapacitás változása a frekvencia illetve idő függvényében epithelsejtek mesterséges felületre (ECIS elektródra) való letapadása során [10]

Mint az összes, általam megtalált irodalomban, itt is soros RC-taggal modellezték a mérőelektród és a gyűjtőelektród közötti tartalmat. A 0 időpont a sejtek médiumba való beöntésének az ideje. A kisfrekvenciás ellenállás ($f < 75$ Hz) abszolút érzéketlen a sejtek letapadására, mivel az elektród-elektrolit határfelület nagy ellenállása dominál ennél a frekvenciánál (A ábrarész). Közepes frekvencia-tartományban ($200 \text{ Hz} < f < 5 \text{ kHz}$) az ellenállás az idő függvényében kétfázisúnak tűnik. A sejtek beöntése után rögtön emelkedés tapasztalható az ellenállásban, majd ez átmegegy lassú

emelkedésbe, aztán hirtelen felemelkedik a végértékére. A sejtek letapadása csak az ellenállás kezdeti emelkedésért felelős, míg a későbbi (10 óra utáni) emelkedés a sejtek közötti ún. tight junctionök létrejöttét tükrözi, amelyek a sejtréteg permeabilitását csökkentik és korlátozzák az áramot a szomszédos sejtek között (R_b). A nagyfrekvenciás ellenállás ($f > 10$ kHz) egy azonnali, de elég kis emelkedést, majd két óra elteltével csökkenést mutat.

A kisfrekvenciás kapacitás ($f < 200$ Hz) kb. invariáns az időben (B ábrarész), majd ahogy nő a frekvencia, úgy lesz a mérés egyre érzékenyebb a sejtek letapadására (látható, hogy az epithelsejtek a beöntés után 2-3 órán belül letapadnak). Az ellenállással ellentétben azonban a nagyfrekvenciás kapacitásra alig van hatással az intercelluláris junctionök későbbi kialakulása a szomszédos epithelsejtek között [10].



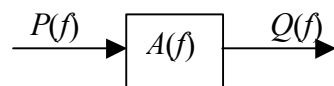
18. ábra. α -thrombin hatása endothelsejtrétegre [11]

Egy harmadik kísérlet során egy gyulladást közvetítő mediátor, az α -thrombin hatását vizsgálták konfluens, tehénből származó pulmonális endothelsejtrétegre. Ugyancsak a 13. ábrán látható elrendezést használták, 4 kHz-es gerjesztéssel. Az α -thrombin az endothelsejtek összehúzódását és az interendotheliális tight junctionök szélesedését, intercelluláris gap-ek kialakulását okozza. Amint a 18. ábrán látszik, ez jól megmutatkozik a mért ellenállásban is: az ábra A részén 25 nM, B részén 50 nM, míg C részén 100 nM koncentrációban adták a médiumhoz az α -thrombint a + jellel jelölt időpontban. A cikk szerzői szerint a kísérlet során a nagyobb változás az impedancia valós részében következett be, ezért a képzetes részét nem is vizsgálták [11].

3. A mérés elméleti alapjai

A diplomaterv célkitűzése olyan mérőrendszer elkészítése, amely kiváltja az amerikai ECIS készüléket, annak elektródáját felhasználva. A feladat nem más, mint az elektródára ránőtt, különböző kezeléseknek kitett endothelsejtréteg komplex impedanciájának folyamatos mérése egyszerre több, a felhasználó által megadható frekvencián, a mért impedanciaértékek megadott időközönkénti eltárolása, végül a különböző frekvenciákon az impedancia-idő függvények dokumentálható felrajzolása az eltárolt értékekből, ahogyan az a cikkekben is látszik, mely grafikonokat aztán orvosok, biológusok a mérés végeztével vizuálisan értékelnek.

A feladat nehézsége abban áll, hogy a biológiai mintán alkalmazott nagyon kis áram hatására létrejövő mV-os nagyságrendű feszültségesés a környezetből származó zajokkal (hálózati 50 Hz, monitor nagyfeszültsége stb.) közel azonos nagyságrendbe esik, azaz olyan mérési módszer kivitelezése válik szükségessé, mely hatékonyan szét tudja választani a zajokat a hasznos jeltől. Erre a frekvenciatartományban van lehetőség, ugyanis, ha ismert frekvenciákon gerjesztünk egy lineáris, időinvariáns rendszert, a gerjesztésre adott válasz kizárólag a gerjesztő-frekvenciákon keletkezik, a többi spektrumösszetevő biztosan zaj.



19. ábra.

Kézenfekvő, hogy ismert frekvenciájú szinuszzel, vagy különböző, ismert frekvenciájú szinuszjelek összegével (ún. multiszínusz jellel) gerjesszünk, ez könnyen előállítható, ráadásul a gerjesztőjel spektrumát (a 19. ábrán $P(f)$) így előre ismerjük, azaz a feladat abban áll, hogy a válaszjel spektrumát ($Q(f)$) előállítsuk, majd a válasz és a gerjesztés spektrumkomponenseinek hányadosából előáll a keresett átviteli függvény ($A(f)$), azaz pontosabban:

$$\hat{A}(f_i) = \frac{Q(f_i)}{P(f_i)} \quad (16)$$

ahol $\hat{A}(f_i)$ becslője $A(f_i)$ -nak minden egyes f_i gerjesztő frekvencián. Természetesen a gerjesztő frekvenciákon is adódhatnak zajok a rendszerhez, ezek kiszűréséhez átlagolni kell.

A válaszjel frekvencia-komponenseinek meghatározására a rezonátor bázisú generátor-megfigyelő pár alkalmazása tűnt a legjobb megoldásnak (az indoklást a 3.1.1. fejezet vége tartalmazza).

3.1. A mérés elve

3.1.1. A rezonátor bázisú generátor-megfigyelő pár [12]

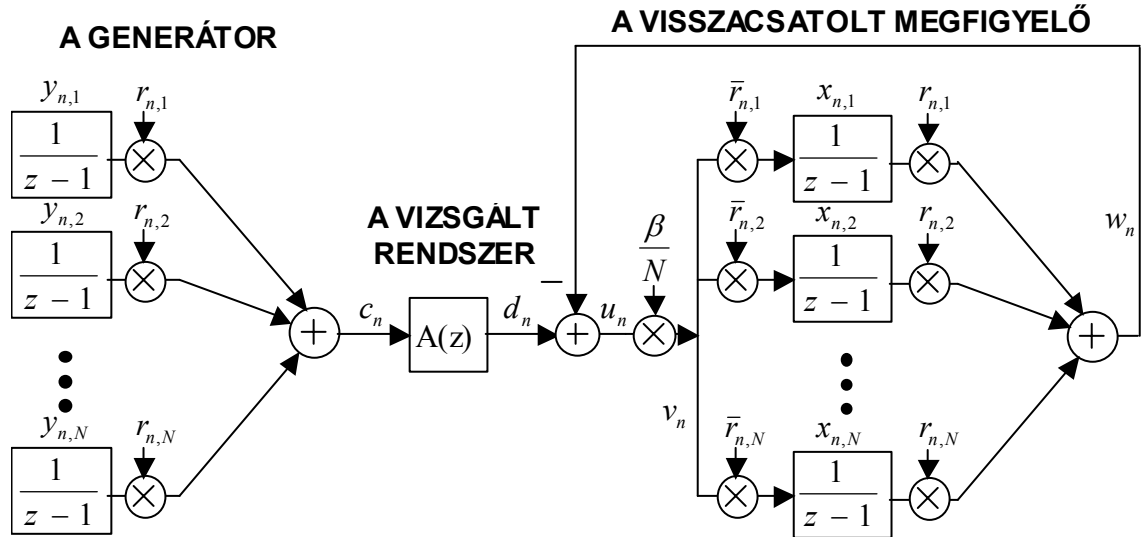
Ha a gerjesztést különböző frekvenciákon működő rezonátorok kimenetének összegeként állítjuk elő, multiszínusz jelet kapunk. A módszer ötlete, hogy a mért rendszer által adott válaszjelet egy, a gerjesztő rezonátorokkal azonos frekvencián működő rezonátor-szettel megpróbáljuk előállítani, ami egy hiba-visszacsatolásos, rekurzív úton megtehető. A módszer modellje a 20. ábrán látható. Az integrátorok fölött azok aktuális tartalma található, ezek lesznek a komplex állapotváltozóink (\mathbf{y}_n és \mathbf{x}_n); a felülvonás komplex konjugáltat, az n index az időlépést, míg N a rezonátorok számát jelöli. Továbbá:

$$r_{n,i} = e^{j2\pi f_i n} \quad (17)$$

ahol

$$f_i = \frac{m_i}{N}, \quad 0 \leq m_i < N, \quad i = 1 \dots N \quad (18)$$

a diszkrét frekvenciák. Mivel a generátor és a megfigyelő integrátorait komplex exponenciálisokkal (17) szorozzuk, ezek csatornái az egységkörön levő egyetlen pólussal rendelkező invariáns rendszert valósítanak meg. Az egységkörön elhelyezkedő pólus azt eredményezi a visszacsatolásban, hogy a magára hagyott rendszer komplex értékű állapotváltozója egy $\omega_i = \frac{2\pi m_i}{N}$ diszkrét körfrekvenciával forgó fazon lesz, hiszen ennyivel forgatja el ütemenként az $\bar{r}_{n,i}$ -vel való szorzás. Ha tehát ilyen körfrekvenciájú szinuszos jelet adunk a bemenetére, akkor azt csillapítás nélkül, fázisszinkron összegzi, így azon a körfrekvencián végtelen az átvitele, azaz rezonancia lép fel. Ezért hívjuk őket rezonátoroknak.



20. ábra. A rezonátor bázisú generátor–megfigyelő pár modellje

Amennyiben $\beta = 1$ és a rezonátor-pólusok az egységkör mentén egyenletesen helyezkednek el, úgy a megfigyelő impulzusválasza véges, a mérési idő N lépés, a megfigyelő egyes rezonátor-csatornáinak amplitúdó-spektruma:

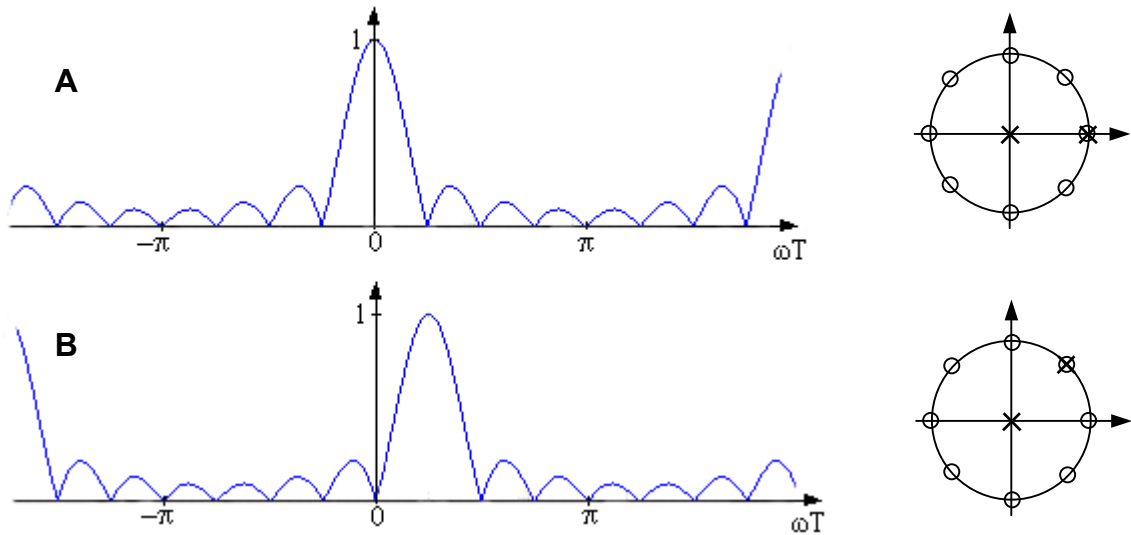
$$|H_i(f)| = \left| \frac{\sin \pi N(f - f_i)}{N \sin \pi(f - f_i)} \right|, \quad i = 1 \dots N \quad (19)$$

(19) minden frekvencián nulla, kivéve amikor $f = f_i$, ekkor pedig az adott rezonátor-csatorna átvitele: $|H_i(f)| = 1$. Ez a mozgó átlagoláshoz hasonló, azonban míg ott csak a $z = 1 + 0j$ -ben lévő zérus esik ki, itt a mozgó átlagolás pólusát elforgatjuk, s a többi $N - 1$ egységgyök pozícióban is kiesik az adott zérus, így a mozgó átlagolásnál megismert alakú, de eltolt pozíciójú sáváteresztő szűrőkarakterisztikákat kapunk (21. ábra).

A megfigyelő szűrőbankként viselkedik, rekurzív DFT-t hajtva végre. Állandósult állapotban a DFT-szűrők kimenetükön a bemenő jel Fourier-sorának megfelelő komplex harmonikus összetevőjét állítják elő fázishelyesen. A megvalósítást tekintve a szűrőbank komplex együtthatójú szűrői konjugált páronként összevonhatók valós együtthatójú másodfokú rezonátortagokká (lásd 3.1.2. fejezet).

Amennyiben $0 < \beta < 1$, úgy a megfigyelő exponenciális átlagolást végez, a rendszer impulzusválasza végtelenné válik. Ekkor a rendszer idő-konstansa:

$$\alpha = 1 - (1 - \beta)^{1/N}. \quad (20)$$



21. ábra. A mozgó átlagolás (A ábrarész) és egy DTF-szűrő (B ábrarész) amplitúdó-karakterisztikája és pólus-zérus képe (o: zérus, x: pólus)

A mérési idő ekkor a megkövetelt mérési pontosságtól függ:

$$K \approx \frac{\log \varepsilon}{\log(1 - \alpha)} \quad (21)$$

ahol ε jelöli a maradó relatív hibát, K pedig a szükséges lépésszámot. Praktikusan a feladat elvégzéséhez megkívánt beállási időből és mérési pontosságból (21) segítségével kell meghatározni α -t, majd α -ból β a következőképpen számolható:

$$\beta = 1 - (1 - \alpha)^N \quad (22)$$

Amennyiben a rezonátor-pólusok az egységkör mentén nem egyenletesen helyezkednek el, a rendszer impulzusválasza β megválasztásától függetlenül végtelen. Ekkor a rendszer ugyan másképp viselkedik, (19) nem érvényes, ami azonban számunkra fontos, hogy (20), (21) és (22) továbbra is érvényben marad.

A megfigyelt rendszer vizsgált frekvenciákon való átvitelének meghatározása egyszerű:

$$\hat{A}(f_i) = \frac{x_i}{y_i}, \quad i = 1 \dots N \quad (23)$$

Jól látható tehát, hogy a felvázolt rezonátoros generátor-megfigyelő pár alkalmas frekvenciatartománybeli on-line identifikációra. A rendszer β értékétől függően exponenciális átlagolást is végez, s mivel a generátor és a megfigyelő egymásnak

megfelelő rezonátorai a rendszer jellegéből adódóan tökéletesen azonos frekvencián működnek, nem lép fel a picket-fence és a leakage jelenség.

Ezen módszer alternatívája a feladat megoldása szempontjából a DFT (ill. FFT) lehetne. A rezonátoros megoldással szemben azonban a DFT-nek több hátránya is van:

- alkalmazhatóságának feltétele, hogy az ω_i diszkrét körfrekvenciáknak az egységkör mentén egyenletesen kell elhelyezkedniük, az FFT-nél N 2-hatvány kell legyen. Ez sok felesleges számítás elvégzését jelentheti, ugyanis a feladat valójában nem a teljes frekvenciaspektrum vizsgálata, hanem csupán néhány, tetszőlegesen megválasztott frekvencia-komponens előállítás.
- a feladat megoldásához elengedhetetlen átlagolást minden egyes DFT spektrumszámítás után külön kell elvégezni minden szükséges frekvencia-komponensre, ami nem csekély extra számításigényt jelent.
- a picket fence ill. leakage elkerüléséhez szükséges ún. koherens mintavétel megvalósítására külön kell figyelmet fordítani.

3.1.2. A rezonátoros megfigyelő megvalósítása

Az előző fejezetben említettem, hogy a megfigyelő rezonátorai kettesével összevonhatóak valós együttthatójú másodfokú rezonátortagokká. Ennek oka abban keresendő, hogy, még ha a rezonátor-pólusok az egységkör mentén nem is egyenletesen helyezkednek el, azonban mindenképp célszerű úgy megválasztani őket, hogy a $\pi < \omega < 2\pi$ diszkrét körfrekvencia tartományon – ami a Nyquist-tétel miatt úgyszemint használható – csak a „hasznos”, $0 < \omega < \pi$ diszkrét körfrekvenciájú AC rezonátorok komplex konjugáltját valósítjuk meg, azaz $r_{n,i} = \bar{r}_{n,N-i}$, $i = 1 \dots (N-1)$, továbbá egy DC rezonátort: $r_{n,N} = 1$. Ezzel biztosítjuk, hogy a generátor és a megfigyelő kimenete (c_n és w_n) valós jel legyen, azáltal, hogy ekkor a megfigyelő állapotváltozói is páronként egymás konjugáltjai: $x_{n,i} = \bar{x}_{n,N-i}$, $i = 1 \dots (N-1)$. Azaz ha

$$x_{n,i} = \gamma + j\delta, \quad r_{n,i} = \lambda + j\mu, \quad \gamma, \delta, \lambda, \mu \in \mathfrak{R} \quad (24)$$

akkor

$$x_{n,N-i} = \gamma - j\delta, \quad r_{n,N-i} = \lambda - j\mu. \quad (25)$$

Ekkor a i . rezonátor-csatorna kimenete:

$$x_{n,i} \cdot r_{n,i} = \gamma\lambda - \delta\mu + j(\gamma\mu + \delta\lambda), \quad (26)$$

míg az $(N-i)$ -ediké:

$$x_{n,N-i} \cdot r_{n,N-i} = \gamma\lambda - \delta\mu - j(\gamma\mu + \delta\lambda). \quad (27)$$

Az i -edik és az $(N-i)$ -edik rezonátor-csatorna kimenetének összege ((26) és (27) összege) valós szám:

$$x_{n,i} \cdot r_{n,i} + x_{n,N-i} \cdot r_{n,N-i} = 2(\gamma\lambda - \delta\mu) \quad (28)$$

Ez pedig azt jelenti, hogy a megfigyelő kimenetének (w_n) előállításakor a rezonátorok kimeneteit ilyen módon párosával összeadva (28) szerint minden két komplex szorzás két valós szorzássá egyszerűsödik, s ha azt vesszük, hogy egy komplex szorzást 4 valós szorzással tudunk végrehajtani, látható, hogy így módon a szükséges valós szorzások száma az eredeti negyedére csökkent, ami jelentős számítási igény csökkenést jelent.

Így, csak a szorzásokat tekintve, minden egyes lépésben $2N$ darab valós szorzás végrehajtására van szükség ahhoz, hogy a megfigyelőnket megvalósítsuk: (28) szerint N darab kell a megfigyelő kimenetének előállításához, és ugyancsak N darab kell az állapotváltozók frissítéséhez, ugyanis

$$x_{n,i} = x_{n-1,i} + u_n \frac{\beta}{N} \bar{r}_{n,i} \quad (29)$$

ahol u_n a vizsgált rendszer ($A(z)$) kimenetének (d_n) és a megfigyelő kimenetének (w_n) különbsége, s mivel $x_{n,i} = \bar{x}_{n,N-i}$, $i = 1 \dots (N-1)$ és $\left(u_n \cdot \frac{\beta}{N}\right)$ valós, ezért:

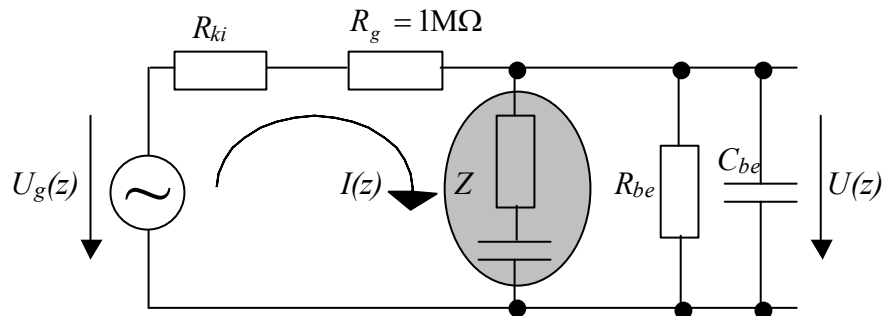
$$re(x_{n,i}) = re(x_{n,N-i}) = re(x_{n-1,i}) + u_n \frac{\beta}{N} re(r_{n,i}), \quad i = 1 \dots N-1 \quad (30)$$

$$im(x_{n,i}) = -im(x_{n,N-i}) = im(x_{n-1,i}) - u_n \frac{\beta}{N} im(r_{n,i}), \quad i = 1 \dots N-1. \quad (31)$$

3.2. Az impedanciamérés módja

A komplex impedancia méréséhez a 13. ábra szerinti elrendezést használtam, ez látható a 22. ábrán. $U_g(z)$ jelöli a multiszinusz-generátor feszültségét, $U(z)$ a mérendő feszültséget, Z a biológiai minta impedanciáját a mérő- és gyűjtőelektród között, R_g egy

fix ohmos ellenállást, R_{ki} a generátor soros ellenállását, R_{be} és C_{be} pedig a mérőeszköz bemeneti ellenállását és kapacitását.



22. ábra. Az impedanciamérés elvi modellje: a szürke RC tag a biológiai mintát reprezentálja

A soros R_g ellenállás használata 3 okból kifolyólag célszerű:

- mivel Z abszolút értéke az általam tanulmányozott irodalmak alapján 2..20 kΩ értékű az endothel monolayer vizsgáló kísérletekben, R_g közbeiktatásával a biológiai mintán átfolyó áram közel konstans lesz
- a biológiai mintán, azaz a sejtrétegen átfolyó áramot korlátozni kell: kihasználva az általam alkalmazandó DSP-kártya (lásd 4.1. fejezet) D/A átalakítóinak amplitúdó-tartományát, $|U_g(z)| = 1\text{ V}$ gerjesztést alkalmazva, R_g közbeiktatása nélkül a sejteken közel mA nagyságrendű áram folyna. Ekkora áramnál már nem lehet garantálni, hogy a sejtekre a rajtuk átfolyó áram ne legyen hatással, nem zárható ki az áram invazív hatása.
- Z méréséhez szükség van a rajta átfolyó áram ismeretére, R_g pedig egy egyszerű áram-feszültség átalakító szerepét is betölti: a biológiai mintán átfolyó áram megegyezik a vele sorbakapcsolt fix értékű ellenálláson folyó árammal, amely a fix értékű ellenálláson eső feszültség és az ellenállás hányadosa:

$$I(z) = \frac{U_g(z) - U(z)}{R_g} \quad (32)$$

$U_g(z)$ és R_g értéke előre ismert, $U(z)$ -t mérve a keresett impedancia értéke meghatározható:

$$Z = \frac{U(z)}{I(z)} = \frac{U(z) \cdot R_g}{U_g(z) - U(z)} \quad (33)$$

A 20. ábrán látható modellben gondolkodva $c_n = U_g(z)$ és $d_n = U(z)$, azaz:

$$y_i = U_g(f_i), \quad x_i = U(f_i), \quad i = 1 \dots N, \quad (34)$$

(33)-ból és (34)-ből pedig:

$$Z(f_i) = R_g \cdot \frac{x_i}{y_i - x_i} \quad i = 1 \dots N. \quad (35)$$

Ahhoz, hogy az irodalommal (lásd 2.5.2. fejezet) összevethető eredményeket lehessen előállítani, a mért impedanciát én is soros RC tagnak tekintem, melynek komponensei (35) alapján:

$$R(f_i) = \operatorname{re}(Z(f_i)) = \operatorname{re}\left(R_g \cdot \frac{x_i}{y_i - x_i}\right), \quad i = 1 \dots N, \quad (36)$$

$$C(f_i) = \frac{-1}{\operatorname{im}(Z(f_i)) \cdot \omega_i} = \frac{-1}{\operatorname{im}\left(R_g \cdot \frac{x_i}{y_i - x_i}\right) \cdot \omega_i}, \quad i = 1 \dots N. \quad (37)$$

3.3. Megvalósítandó mérési funkciók

Az irodalom tanulmányozása alapján (lásd 2.5.2. fejezet) és a felhasznált jelfeldolgozó processzor és kártya képességeit figyelembe véve (lásd 4.1. fejezet) a létrehozandó mérőeszköz funkcióit a következőképpen specifikálom:

- egyszerre maximum 2 elektródon való mérés lehetősége (kétcsatornás esetben a két csatorna következőkben felsorolt mérési paraméterei megegyeznek, a csatornaszám jele: *ch*)
- egyszerre maximum 14 különböző frekvencián való mérés lehetősége; a lehetséges mérési frekvenciák 0.1 kHz-től 18 kHz-ig 0.1 kHz-es felbontással szabadon állíthatók (a frekvenciák darabszámának jele: *L*, a frekvenciák vektora: *f_i*)
- a mért értékek mintatárolási periódusideje (jele: *T*) 1 másodperctől 15 perc időtartamig másodpercenkénti felbontással szabadon állítható
- a lehetséges mérési időtartam (jele: *t_m*) perces felbontással beállítható, a maximális mérési időről (mely *ch*, *L* és *T* függvénye, mivel a DSP memóriája – ahova a mért értékeket tároljuk – nem korlátlan) a mérés elején a felhasználói felület tájékoztat
- a felhasználói felület a mérés indításakor tájékoztat a mérés befejeződésének pontos időpontjáról

- a mérés kommentekkel látható el és a mérés minden adata a mérés végeztével egy külön file-ba menthető el
- a felhasználói felületen a mérés befejeztével megjeleníthetők a mért soros ellenállás és kapacitás-értékek az idő függvényében a mérés során bevitt kommentekkel együtt.

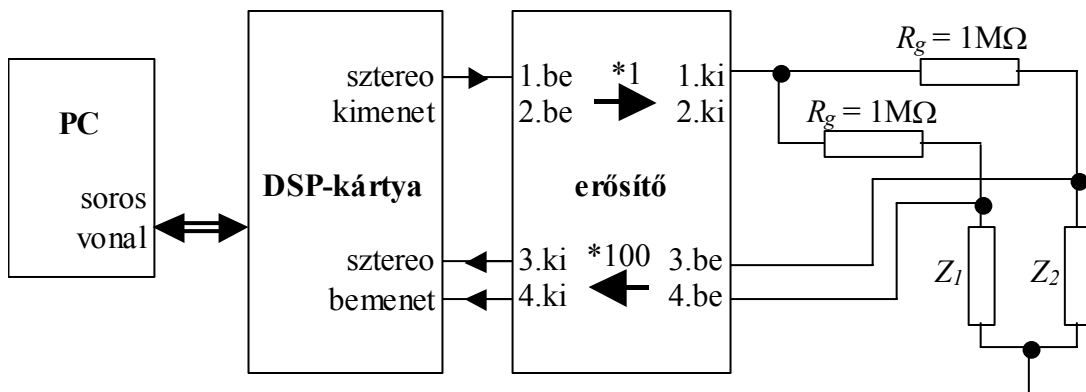
4. Megvalósítás

A BME Méréstechnika és Információs Rendszerek Tanszék DSP laborjában, az itt fellelhető eszközökkel dolgoztam. A rezonátoros generátor-megfigyelő párt az Analog Devices cég ADSP –2181-es jelfeldolgozó processzorát tartalmazó ADSP-21xx EZ-KIT Lite fejlesztőrendszerével valósítottam meg. A felhasználói felületet MATLAB alatt készítettem, egy MATLAB program végzi a DSP kártyával való kommunikációt, az impedancia kiszámítását ((36) és (37) alapján), az impedancia-idő függvények kirajzolását. A MATLAB egy, erre a célra készített toolboxa (Dspevm toolbox) segítségével kommunikál a DSP-kártyával, melyet egy több éve a tanszéken diplomázott hallgató készített.

Az elektródával soros ellenállás (R_g) értékét $1\text{ M}\Omega$ -nak választva, és feltételezve

a biológiai minta $Z = 2\dots 20\text{ k}\Omega$ -os ellenállását $\left| \frac{U(z)}{U_g(z)} \right| \approx \frac{|Z|}{R_g + |Z|} \approx \frac{1}{500} \cdot \frac{1}{50}$, ez pedig

azt jelenti, hogy a mérésstartomány kihasználásához, $U(z)$ pontos méréséhez azt mintavételezés előtt erősítenünk kell. Erre a célra rendelkezésemre állt egy Brüel&Kjaer gyártmányú, NEXUS 2693 típusú négycsatornás erősítő, mely 4 csatornájának az erősítése különböző értékre állítható, bemenetei AC csatoltak, bemeneti impedanciájuk $1\text{ M}\Omega \parallel 100\text{ pF}$, a kimeneti impedanciák értéke $50\Omega \parallel 500\text{ pF}$, a csatornák átvitele a $0.1\text{ Hz} \dots 100\text{ kHz}$ tartományban biztosított [17]. Ismerve R_g értékét ($1\text{ M}\Omega$) és Z lehetséges értéktartományát ($2 \dots 20\text{ k}\Omega$ sorosan $2 \dots 5\text{ nF}$ -dal) az erősítő ki- és bemeneti impedanciái hatására (lásd 22. ábra) a mérési eredmények elhanyagolható mértékben változnak a valós értékekhez képest. A konkrét mérési elrendezés a 23. ábrán látható.

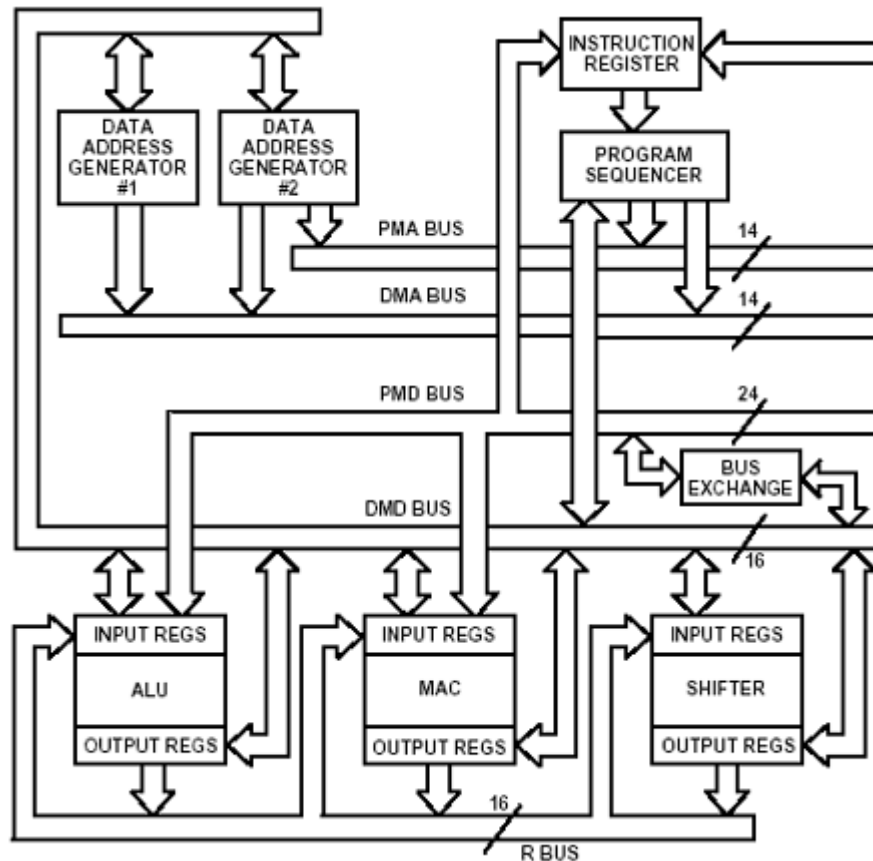


23. ábra. A konkrét mérési elrendezés

4.1. ADSP-2181

4.1.1. A processzor

Az ADSP-2181 fixpontos, 16 bites jelfeldolgozó processzor, melynek felépítése a 24. ábrán látható [13]. A processzor egy 16 bites adatmemóriát és egy – adattárolásra is használható – 24 bites programmemóriát tartalmaz, melyek egyenként 16 kszó kapacitásúak.



24. ábra. Az ADSP-2181 magjának blokkvázlata [13]

Az aritmetikai műveleteket 3 egymástól független egység: az ALU, a MAC (Multiplier/Accumulator) és egy shifter végzi. Látható, hogy ezek egy külön buszon (R-busz) keresztül kapcsolatban vannak, így a memóriákhoz vezető adatbuszok használata nélkül tudnak adatot cserélni. Ez a 3 buszos rendszer lehetővé teszi egyetlen fetch-ciklusban 2 operandus felhozatalát. A processzor műveletvégzési ciklusának periódusideje 25 ns, sebessége 33MIPS.

A processzor a két belső memóriához két címaritmetikai egységet tartalmaz: egyikük csak az adat-, míg másikuk a program- és az adatmemóriát is képes címezni.

Az indirekt címzésre a címképző egységek egyenként 4 regisztert tartalmaznak, melyek cirkuláris bufferekként is működhetnek.

A processzor ezen tulajdonságainak köszönhetően nagyfokú párhuzamosítást tud végrehajtani, egyetlen ciklus alatt képes:

- generálni a következő memóriacímet,
- felhozni a következő utasítást,
- mozgatni két adatot,
- frissíteni a két címaritmetikai egységet,
- egy számítási műveletet végrehajtani.

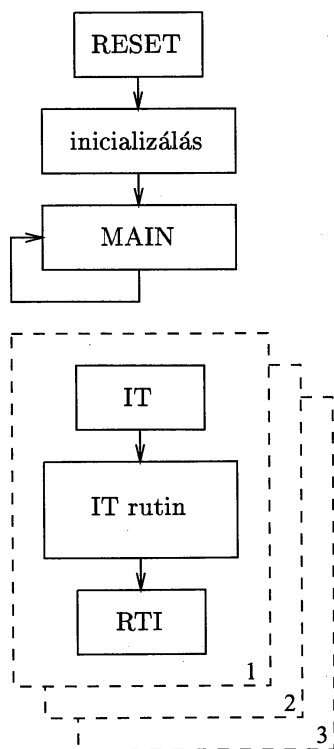
4.1.2. A fejlesztőrendszer

Az ADSP 21xx EZ-KIT Lite DSP kártya tartalmazza az ADSP-2181-es processzort, egy AD1847 típusú sztereó A/D – D/A átalakítót, egy RS-232 interfészt a PC-vel való kommunikációra, egy-egy sztereó analóg be- és kimenetet, egy RESET és egy megszakításkérő nyomógombot [14]. Az A/D – D/A átalakító 16 bites, szigma-delta modulációs elven működik, bemenetei és kimenetei AC csatoltak, felső működési határfrekvenciája 48 kHz. A kártya nem tartalmaz RAM-ot (csak a DSP indulásához szükséges EPROM-ot), így csak olyan program fejleszthető rajta, amely megelégszik a processzor belső memóriájával. A kártya egy gomb segítségével újraindítható, egy másik gomb a processzor egy megszakítást kérő lábára van kötve.

A tetszőleges szövegszerkesztővel megírt gépi kódú programot DOS ablakban lehet fordítani, ill. linkelni. A DSP kártya a PC-hez soros vonalon kapcsolódik. A PC-n egy Windows alatti program (jelen diplomatervezés esetében a MATLAB) kommunikál a kártyával, segítségével lehet a már lefordított és linkelt futtatható programot a kártyára letölteni és elindítani, a DSP processzor program- és adatmemóriájának tartalmát olvasni vagy írni. A PC-vel való kommunikációt a kártyán egy ún. monitorprogram szolgálja.

4.2. A DSP program és a felhasználói felület

A jelfeldolgozó programok egy általánosan alkalmazott struktúráját mutatja a 25. ábra. A program futása az inicializáló résszel kezdődik: itt történik a processzor beállításainak rögzítése (pl. IT prioritások, számábrázolási mód) és itt kapnak kezdőértéket a változók. Az inicializálás alatt a megszakítások tiltva vannak. Miután az



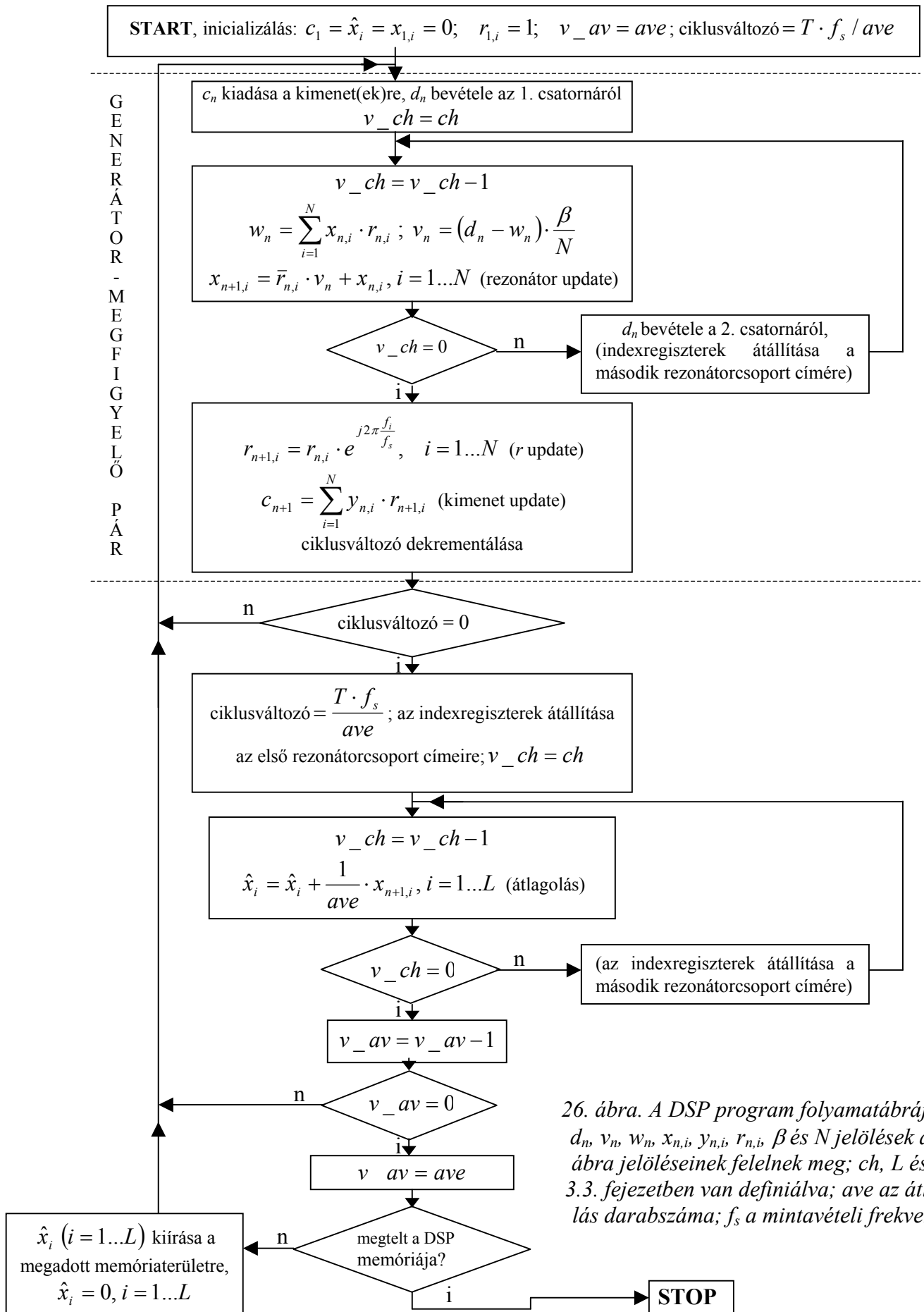
25. ábra. A DSP programok struktúrája

összes beállítás megtörtént és a megszakítások is engedélyezve lettek, a „főprogram” (MAIN) következik, amely azonban nem csinál semmit, csak magára ugrik vissza, amíg megszakítás nem érkezik.

A megszakítás tartalmazza a tulajdonképpeni jelfeldolgozó programot. Követelmény, hogy az IT rutin a következő megszakításig lefusson: a program szigorú valós idejű követelményeket kell kielégítsen. A gyors végrehajtást szolgálják a párhuzamos utasítások: azok az utasítások, amelyek külön egységet és külön buszt használnak, párhuzamosan is végrehajthatók. Ez azonban szükségessé teszi a gépi nyelvű programozást, mert a létező C-fordítók sok esetben nem használják ki a processzor adta párhuzamosítási lehetőségeket.

4.2.1. Az IT rutin

A rezonátoros megfigyelőt megvalósító, általam írt IT rutin folyamatábrája a 26. ábrán látható. A rutin a rezonátoros megfigyelő által végzett exponenciális átlagolás után a rezonátor állapotváltozók kívánt mintatárolási periódusidejénél (T) gyakrabban félretett adatokból még ideális átlagolást is végez, ezen átlagolás darabszámát a rutinban az ave változó tárolja. (Az exponenciális átlagoláson felül végrehajtott ideális átlagolás megvalósításának okát lásd a 5.1. fejezetben!) A β , az L , a ch , a T , az ave változókat, az IT rutin végrehajtási gyakoriságát megadó f_s változót, valamint a rezonátorok működési frekvenciáját tartalmazó f_i vektort a DSP programot indító, általam írt MATLAB program a DSP program indítása előtt letölti a DSP megfelelő memóriarekeszeibe, azaz az IT rutin változói egy részének inicializálása már ekkor végbemegy.



26. ábra. A DSP program folyamatábrája. c_n , d_n , v_n , w_n , $x_{n,i}$, $y_{n,i}$, $r_{n,i}$, β és N jelölések a 20. ábra jelöléseinek felelnek meg; ch , L és T a 3.3. fejezetben van definiálva; ave az átlagolás darabszáma; f_s a mintavételi frekvencia

Az IT rutin által használt többi változó fix, azok a DSP program inicializálási részében kapnak értéket, amint azt a 26. ábra első doboza tartalmazza.

Mivel a DSP kártya sztereo A/D és D/A átalakítót tartalmaz, egyszerre maximum 2 párhuzamos mérés végrehajtására van lehetőség ($ch = 1..2$), azaz az elektróda két cellájára ugyanazt a gerjesztést adva mérhető a két cella válasza. Ehhez két rezonátoros megfigyelőt kell létrehozni, azaz a rezonátor állapotváltozóiból ($x_{n,i}$) és azok átlagolt értékeiből (\hat{x}_i) is két szetet kellett inicializálnom.

$r_{n,i}$, $x_{n,i}$ és \hat{x}_i komplex számok, melyeket a DSP-vel természetesen csak a valós és a képzetes rész külön változóban történő ábrázolásával lehet kezelni.

c_n kiadása a kimenetre, majd az első csatornáról d_n bevétele után a megfigyelő kimenetének (w_n) kiszámítását a 3.1.2. fejezetben leírtak alapján végzem el, azaz:

$$w_n = 2 \sum_{i=1}^{\frac{N-1}{2}} (re(x_{n,i}) \cdot re(r_{n,i}) - im(x_{n,i}) \cdot im(r_{n,i})) + x_{n,N} \quad (38)$$

ahol $x_{n,N}$ a DC rezonátor állapotváltozója és $\frac{N-1}{2} = L$. Mivel $re(r_{n,i})$ -t és $im(r_{n,i})$ -t a programmemóriában tárolom, w_n kiszámításakor nagyfokú párhuzamosítást tudok elérni, lévén, egyetlen ciklus alatt felhozom pl. $re(x_{n,i})$ -t az adatmemóriából, $re(r_{n,i})$ -t a programmemóriából s még egy szorzást is elvégzek. A megfigyelő kimenetének kiszámítása után a rezonátor állapotváltozó-vektorának frissítése következik. Kétszatornás esetben újra elvégzem (38)-at és frissítem a rezonátor állapotváltozókat, immár a második rezonátor szeten.

Ezután az r_n vektor frissítése következik, majd a kimenet (c_n) frissítése. Itt kell kitérnem a generátor rezonátorok állapotára: a generátor rezonátor állapotváltozók abszolútértéke egymással egyenlő és konstans: $|y_{n,i}| = y$, $n = -\infty.. \infty$, $i = 1..N$, azaz minden vizsgálati frekvencián azonos amplitúdójú szinuszjelet adok ki. Ezzel megvalósítottam a generátor és megfigyelő rezonátorokat, melyek állapotváltozói a mintavételi frekvenciával frissülnek.

A „ciklusváltozó” kezdeti értéke a mintatárolási periódusidő és a mintavételi frekvencia szorzatának annyiad része, amennyi az utólagos ideális átlagolás darabszáma, ennyiszor fut le a rezonátorbázisú generátor-megfigyelő pár frissítése anélkül, hogy az állapotváltozók értéke figyelembevételre kerülne.

Ezután a megfigyelő rezonátorok állapotváltozóinak ideális átlagolása következik, majd az állapotváltozók egy megadott, kijelölt memóriaterületre való írása abban az esetben, ha ez a kijelölt memóriaterület még nem telt meg.

4.2.2. A MATLAB program

A DSP program kiszolgálását és az impedancia-idő függvények megjelenítését egy-egy, általam írt MATLAB program végzi el. A DSP-vel kommunikáló MATLAB program (kiserlet.m) funkciói a következők:

- felhasználói felületet képezve a felhasználó által megadható paraméterek (úgy mint csatornaszám, vizsgálati frekvenciák, mintatárolási periódusidő, a mérés időtartama, a kísérlet leírása) bekérése (lásd 27. ábra)
- a bekért paraméterekből a DSP-nek átküldendő változók létrehozása (többek között pl. $|y_{n,i}|=y$ kiszámítása), majd letöltése a DSP processzor megfelelő memóriarekeszeibe
- a DSP program elindítása

```
Hány csatornán akar mérni (1 vagy 2)? 2
A minimális vizsgálati frekvencia 0.1 kHz, a maximális 10 kHz,
maximum 14 frekvenciaértéket adhat meg, aminek oszthatónak kell lennie 0.1 kHz-cel?
Adja meg szögletes zárójelek között a kívánt frekvenciá(ka)t kHz-ben: 4
Hány másodpercenként tárolja el az adatokat(1...999)? 60
A mérés időtartama percben (1...896): 896
Mérés tárgya az 1. csatornán: HUVEC (ctrl)
Mérés tárgya a 2. csatornán: HUVEC (VEGF; 100 ng/ml)
Kísérlet leírása:
Mérés indítása folyamatban...
A mérés kezdete és vége:          13:02 >>>> 03:50
A kísérlet időtartama: 14 hour 50 min 51 sec
Nyomja meg duplán a kártya INTERRUPT gombját, majd ha villog a LED, nyomjon ENTER-t?
Adatok letöltése folyamatban...
Megjegyzés: kezelés 200. percben; ctrl-illa kezelt-fekete
Az adatok elmentve: Dec29_1.mat
```

27. ábra. A kiserlet.m file által képzett felhasználói felület

- a mérés kezdeti és végidőpontjának kijelzése

- a mérés végén a mért adatok (az átlagolt megfigyelő rezonátor állapotváltozók: \hat{x}_i -k) felhozatala a DSP memóriájából
- a DSP kártya D/A és A/D átalakítója, illetve az erősítő által a mérésbe vitt fázisszög-eltolás korrigálása \hat{x}_i -ken
- az aktuális dátumból automatikus file-név generálás, majd a MATLAB munkakönyvtárába a mérés adatait és paramétereit tartalmazó mat kiterjesztésű file mentése.

A DSP mérési eredményeit feldolgozó és az impedancia-idő függvényeket megjelenítő MATLAB program (feldolgoz.m) a következőket végzi el:

- bekéri a feldolgozandó mat file nevét
- kiírja a mérés paramétereit (csatornaszám, vizsgálati frekvenciák, mintatárolási periódusidő, a mérés időpontja és időtartama, a kísérlet leírása: lásd 28. ábra)
- kirajzolja a mért ellenállás és kapacitás-idő függvényeket.

```

Adja meg a file nevét kiterjesztés nélkül: dec29_1

A mérés paramétereit:

2 csatornás mérés,
1 frekvencián (4 kHz),
az adatok 60 másodpercenként lettek eltárolva,
a mérés időtartama 14 óra 50 perc 51 másodperc.

A kísérlet leírása:

1. csatorna: HUVEC (ctrl)
2. csatorna: HUVEC (VEGF; 100 ng/ml)

Megjegyzés:

kezelés 200. percben; ctrl-111a kezelt-fekete

A kísérlet kezdete: 2004.12.20 19:02

```

28. ábra. A feldolgoz.m file által visszaadott adatok

4.3. Az elektróda-befogadó egység

Ahhoz, hogy az amerikai ECIS készülék elektródáját használhassam, kellett készítenem egy olyan eszközt, amely fix befogást ad az elektródának, továbbá az elektróda vékony arany kontaktusaihoz bontható érintkezősort biztosít. A BME Elektronikai Technológia Tanszéken dr. Sántha Hunor adott ötletet és anyagot a megvalósításhoz, az elkészült elektróda-befogadó egység a 29. ábrán látható.

A befogadóegység alja 8 mm vastag plexi lemez, melyre ragasztással 4 kis műanyag lábat rögzítettem. A plexi alaplemezre egy egy oldaláról nyitott téglalap alakú, műanyag keretet ragasztottam, melynek belső méretei és vastagsága megegyeznek az ECIS elektróda hordozó lemezének méreteivel és vastagságával. A keret két hosszabbik oldalára rögzítettem egy-egy plexi lemez csíkot, mely 1-2 mm-t rálóg a keret belsejére: ezáltal egy vezető sín jött létre, a téglalap alakú keretbe a nyitott oldala felől betolható az elektród.

Az elektród arany érintkezési pontjaihoz való csatlakozást aranyozott rugós érintkezők valósítják meg: 9 db rugós arany érintkezőt egy téglatest alakú teflon tömbbe rögzítve valósítottam meg az érintkezősort, mely két réz távtartón keresztül, oldható csavarkötéssel rögzíthető a befogadó-egységhez. A csavarkötés szárnyas anyákkal kézzel is könnyen bontható/zárható. Az elektróda befogadó-egység alaplemezére egy RS232 csatlakozóalj van szerelve, melybe egy árnyékolt 10 erű kábel segítségével bekötöttem a rugós érintkezőket.



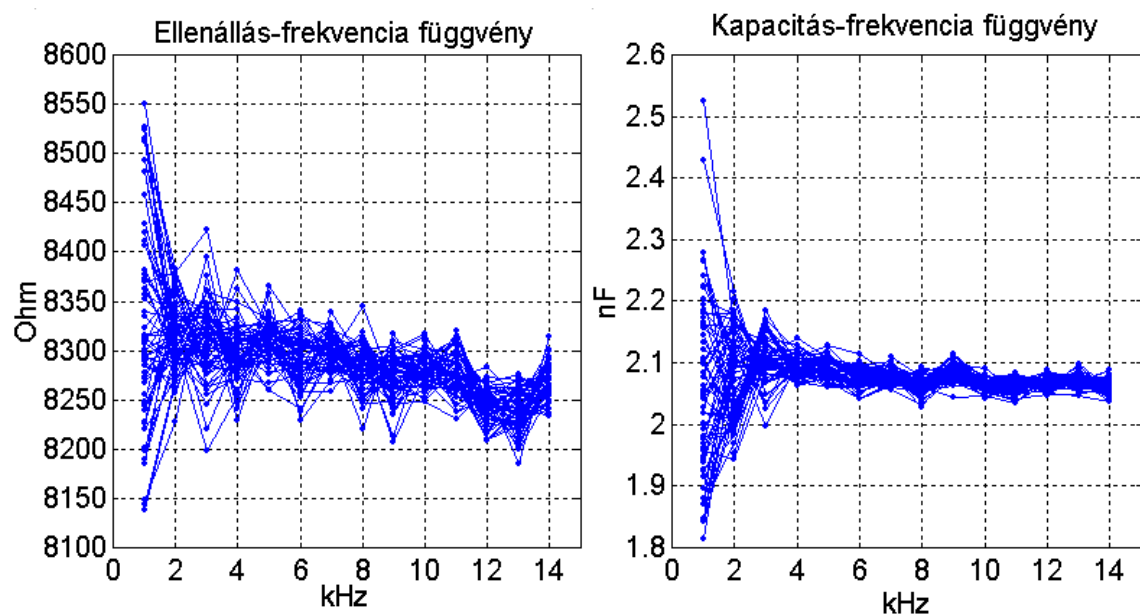
29. ábra. Az elektróda-befogadó egység

5. Eredmények

A rezonátoros struktúrát megvalósító IT rutint előbb fix alkatrészeken (soros RC-tagokon) teszteltem, majd miután a rendszer fix alkatelmelekkel megfelelően működött, az ECIS készülék elektródáját (lásd 11. ábra) és az elektróda-befogadó egységet (lásd 4.3. fejezet) felhasználva csapvíz, fiziológiás sóoldat és sejttenyésztő médium impedanciáját mértem, végül különböző kezeléseknek kitett endothel- és epithelsejtréteg elektromos viselkedésének vizsgálatára tettem kísérleteket a SOTE Kórélettani Intézetében, Bodor Csaba aktív segítségével.

5.1. Mérések fix alkatrészekon

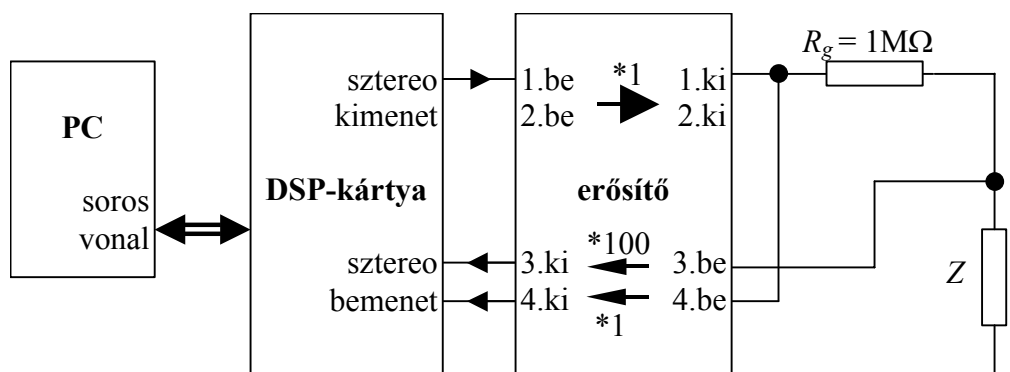
Figyelembe véve, hogy a cikkek alapján (2.5.2. fejezet) az endothelsejtréteg impedanciája a soros RC-moddal a $2..20\text{k}\Omega$ ellenállással sorban $2..5\text{nF}$ kapacitás tartományban mozog, $8.2\text{k}\Omega$ -os ellenállással 2.2nF -os kondenzátort kapcsoltam sorba, s az így keletkezett soros RC tagot mértem. Ekkor a DSP IT rutin még nem hajtott végre ideális átlagolást a megfigyelő állapotváltozóin (azaz a 26. ábrán $ave = 1$). $T = 5$ másodperc, $t_m = 5$ perc, $L = 14$, $f_i = i \text{ kHz}$ $i = 1..14$ beállítások mellett a mérés eredménye a 30. ábrán látható. Az ábrán az egy időpontban eltett, különböző frekvencián mért adatok a szemléletesség kedvéért vonallal vannak összekötve.



30. ábra. Fix alkatrészen végzett mérés frekvenciafüggvényei

Látható, hogy alacsony frekvencián a mért soros ellenállás és kapacitás értéke is elfogadhatatlan mértékben szórt, de a nagyobb frekvenciákon sem voltam megelégedve a szórás értékével. A rezonátorok beállási idejét és maradó hibáját szabályozó β konstans (lásd 20. ábra) rossz beállítására gyanakodtam, de nem tudtam elérni olyan β értéket, melynél a maradó hiba kisebb lenne (a rezonátorok beállása a β értékek széles tartományában a másodperc törtrésze alatt megtörtént).

Arra gondoltam, hátha javul a helyzet akkor, ha visszamérem a gerjesztést, s a gerjesztés visszamért értékével számolok az elméleti érték helyett. Így a mérési elrendezésem a 31. ábrán látható lett.

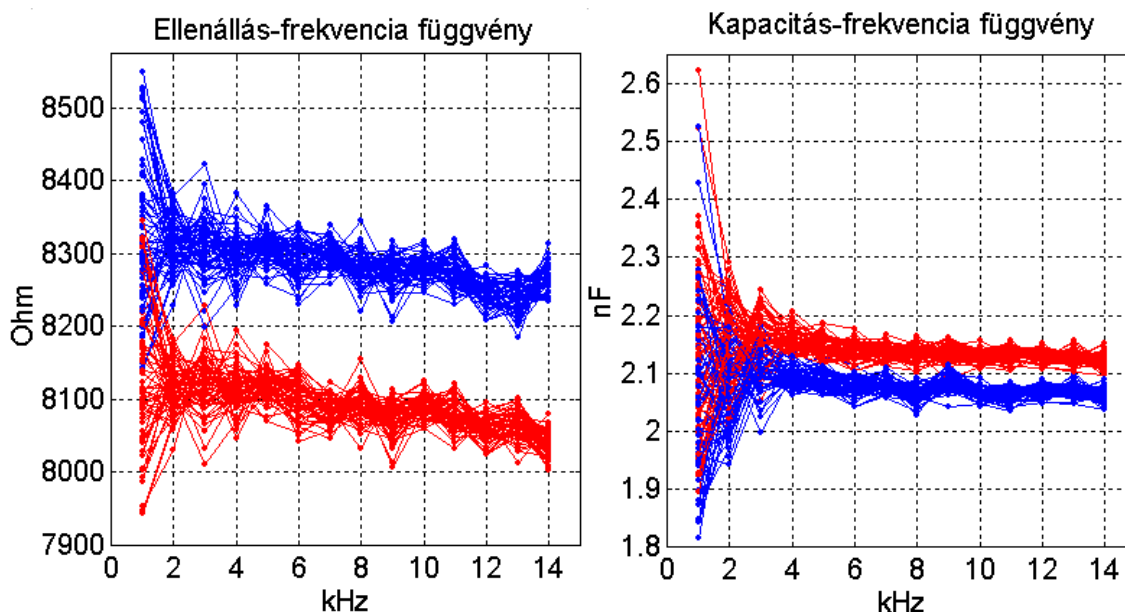


31. ábra. A gerjesztés visszaméréséhez átalakított mérési elrendezés

A beállítások változatlanul hagyása mellett ($T = 5$ másodperc, $t_m = 5$ perc, $L = 14$, $f_i = i$ kHz, $i = 1..14$) a 32. ábrán látható eredményt kaptam, melyen egyszerre jelenítettem meg az ugyanazon mérésből származó, kétféle módon kapott eredményt: a piros szín a visszamért gerjesztés alapján számolt, míg a kék az elméleti gerjesztéssel számolt impedancia-összetevőket jelenti.

Látszik, hogy az elméleti gerjesztéssel számolás a visszamért helyett csupán statikus hibát eredményez, a mérés szórása ugyanakkor kb. ugyanannyi mindkét módszer esetében. Az endothelsejtréteg vizsgálatához a mérés abszolút pontossága kevésbé fontos, mivel a mért impedancia-összetevők időbeni változása az érdekes, ellenben a mért értékek relatív szórásának ezrelék nagyságrendben kellene lennie (lásd 16. ábra). A nagy szórást az igen kis, μA nagyságrendű árammal végrehajtott mérés során a viszonylag hosszú összekötő kábelek ill. a mért alkatrészek által összeszedett zajok okozhatják.

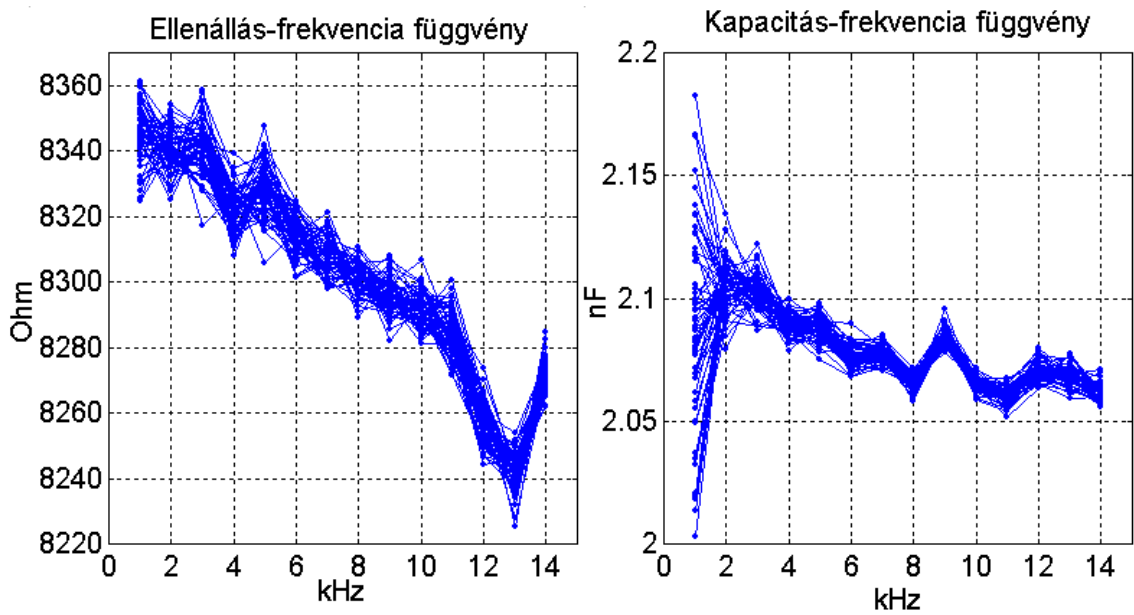
Ekkor jött az ötlet, hogy mi lenne, ha az eltárolt értékeket utólag átlagolnám. Ezt háromféleképpen tehettem meg: DSP-vel átlagolok, MATLAB-bal, vagy mindkettővel.



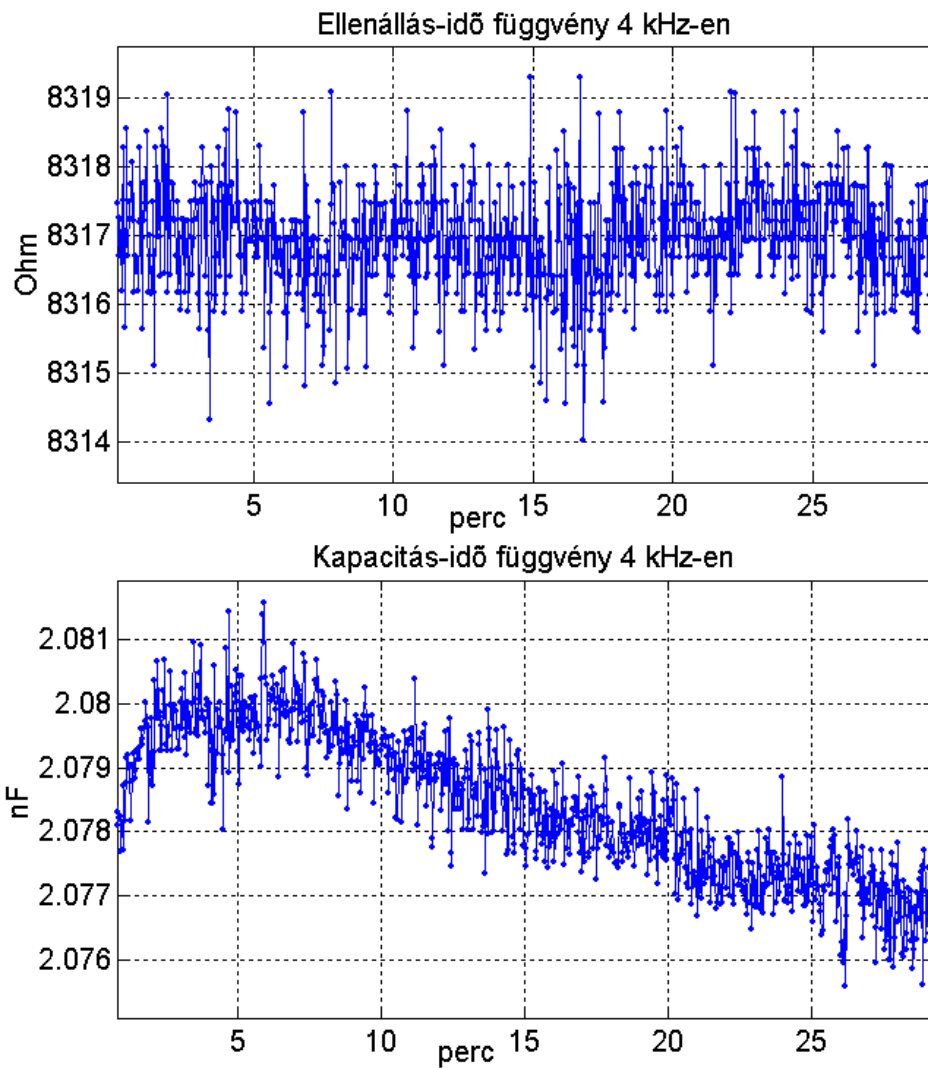
32. ábra. Fix alkatrészen végzett mérés eredményei az elméleti gerjesztéssel (kék görbék) ill. a visszamért gerjesztéssel számolva (piros görbék)

A DSP szűkös belső memóriamérete miatt célszerűnek tűnt a DSP-vel való átlagolás, mivel a MATLAB-bal való átlagoláshoz az átlagolás darabszámával arányosan több mintát kell eltárolnia a DSP-nek. Hamar rájöttem azonban, hogy 2..4-szeres átlagolásnál többet nem szabad a DSP-vel végrehajtanom, mivel az ideális átlagolás során az összegzés előtt a mért értékeket le kell osztanom az átlagolás darabszámával, s ez a fixpontos számábrázolásban nagyszámú átlagolás esetén jelentős felbontásbeli romlást eredményez, amivel épp ellenkező eredményt érnek el. Végül számos mérés során arra jutottam, hogy akkor érek el optimális eredményt, ha a DSP-vel és a MATLAB-bal is 4-4 mintát átlagolok, ekkor már a mért értékek szórása is elviselhető és a DSP memóriája is elegendőnek bizonyul akár több napos méréshez is. Az utólagos átlagolással végrehajtott mérés ($T = 5$ másodperc, $t_m = 5$ perc, $L = 14$, $f_i = i$ kHz, $i = 1..14$, $ave = 4$) eredménye a 33. ábrán látható, amit a 30. ábrával összehasonlítva szembeötlő az eredmény.

Csupán egy frekvencián mérve azonban a szórás értéke jóval kisebb (lásd 34. ábra, ahol a mérés paraméterei: $T = 2$ másodperc, $t_m = 30$ perc, $L = 1$, $f_1 = 4$ kHz, $ave = 4$). Ennek oka az, hogy multiszínus gerjesztéskor a fixpontos számábrázolás miatt minden szinuszjel amplitúdóját (y) csökkenteni kell ahhoz, hogy összeadásuk után is még beleférjenek a számtartományba, így az egyes frekvenciákon csökken a gerjesztő, így a válasz szinuszjel felbontása is. Egyetlen szinuszjelből álló gerjesztés esetén viszont a teljes számtartomány kihasználható az adott mérési frekvencián.



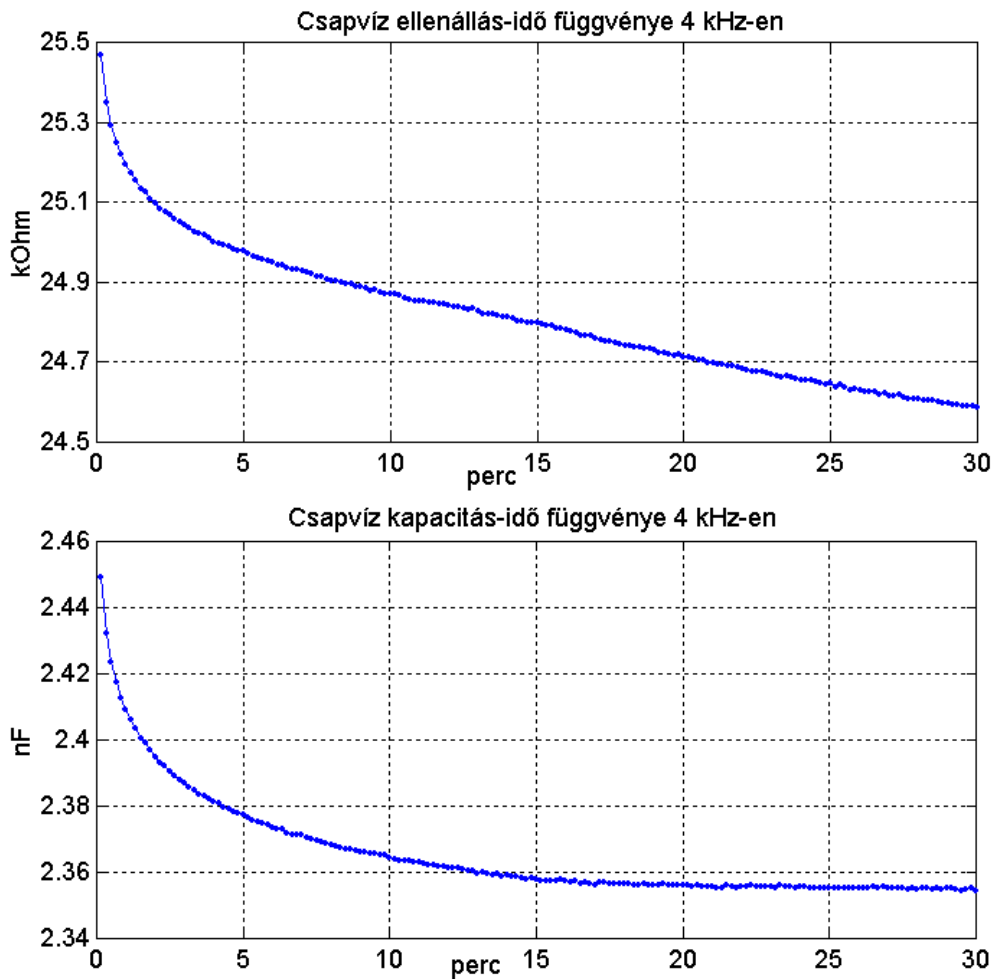
33. ábra. Fix alkatrészen, utólagos átlagolással végzett mérés frekvenciafüggvényei



34. ábra. Fix alkatrészen végzett mérés időfüggvényei

5.2. Mérések csapvízen és sejttenyésztő médiumon

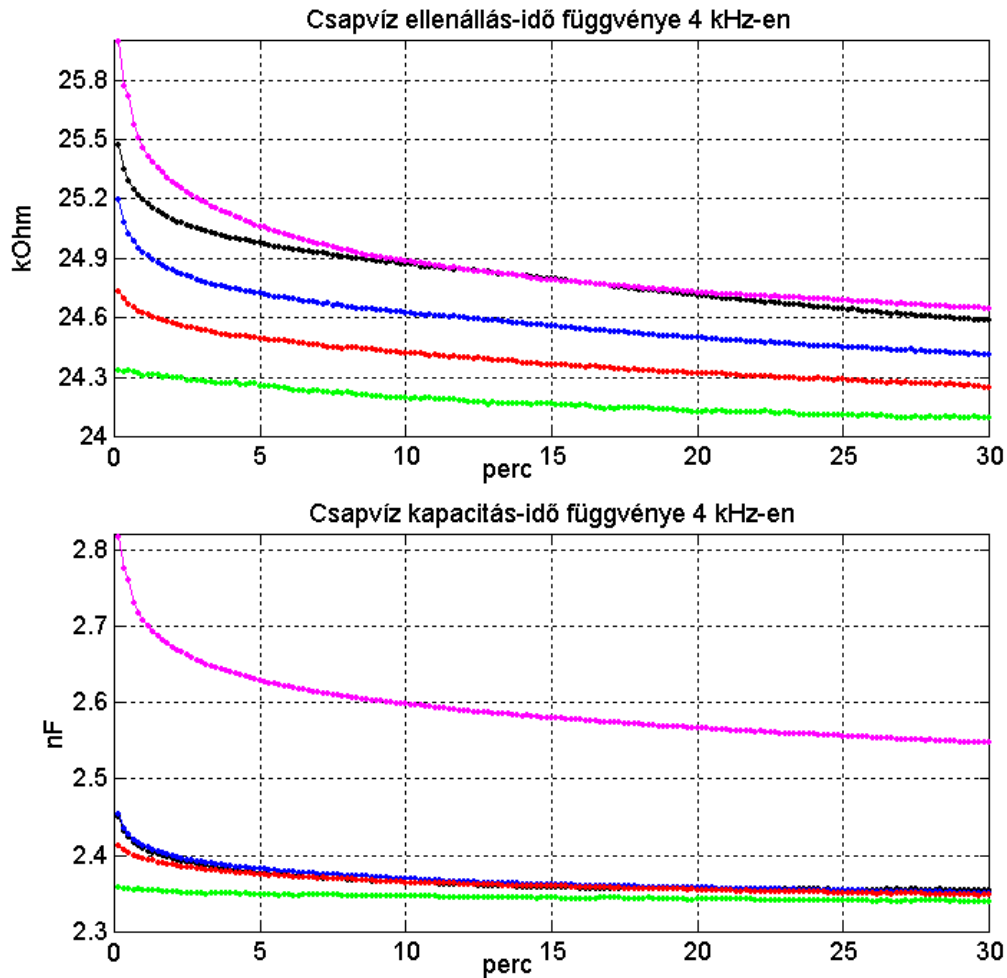
Csapvíz ill. médium vizsgálatát az ECIS elektródával végeztem. Leginkább 4 kHz-en mértem, mert az irodalomban (2.5.2. fejezet) is ez a mérési frekvencia fordul elő leggyakrabban. Csapvízen $T = 10$ másodperc, $t_m = 30$ perc, $L = 1$, $f_1 = 4$ kHz, $ave = 4$ paraméterek mellett végzett mérés eredménye a 35. ábrán látható.



35. ábra. Csapvízen végzett mérés időfüggvényei

A mérés eredménye igen meglepő volt, a mérés megismétlése is hasonló eredményekkel járt. Csak arra tudtam gondolni, hogy esetleg már a μA -es áram is kémiai változásokat okoz a vízben, ezért megpróbálkoztam kisebb áram alkalmazásával. Egymás után 5 mérést végeztem az előzővel megegyező paraméterekkel. Az első két mérés során az eddig megszokott elrendezést használtam, a harmadik mérésnél az erősítő azon csatornájának erősítését, amelyre a gerjesztés volt kötve, 1/3-ra állítottam be, a mérőcsatorna erősítését a mérés pontosságának megtartása érdekében az eredeti érték 3-szorosára, így a csapvízen harmadakkora áram folyt, mint az előző két esetben.

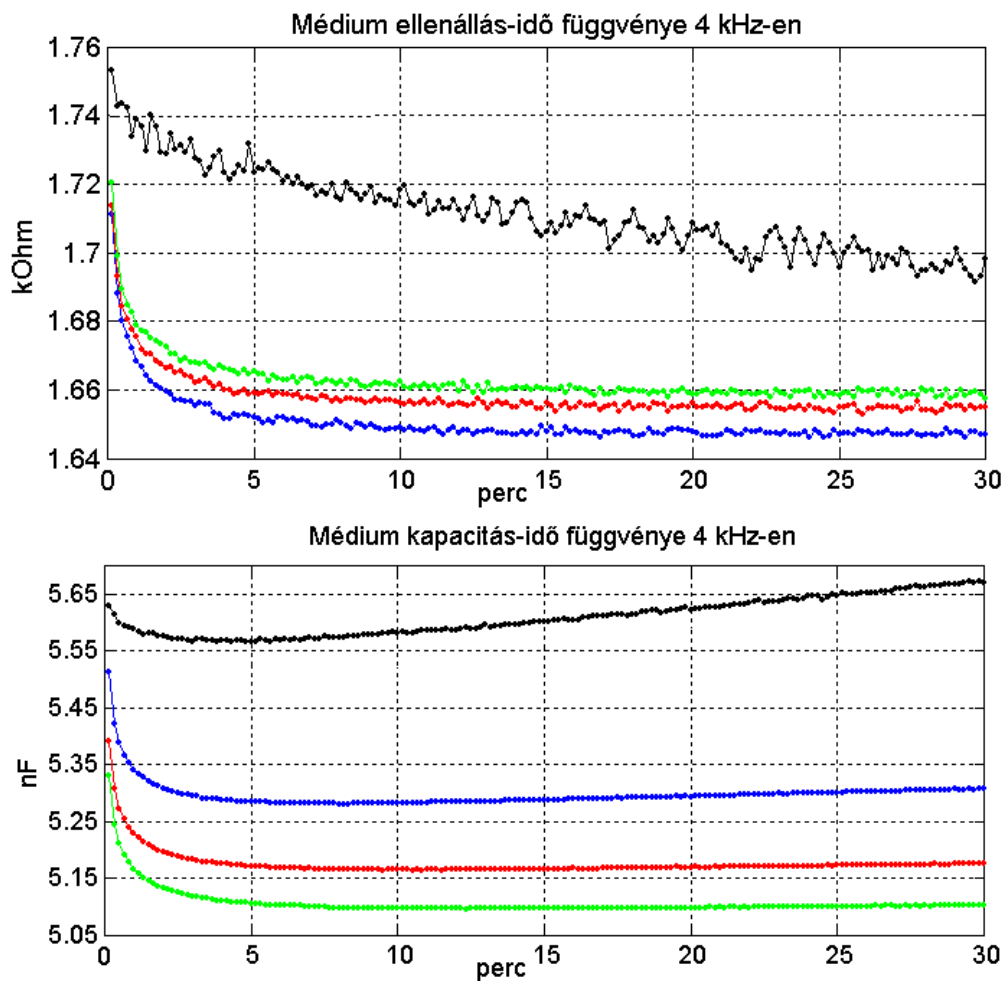
A negyedik esetben, az előző esethez hasonlóan eljárva az áramot tizedére csökkentettem, majd az ötödik mérés során az eredeti áram háromszorosát alkalmaztam. A sorban egymás után elvégzett mérések eredményei a 36. ábrán láthatók: az első mérés fekete, a második kék, a harmadik piros, a negyedik zöld és az ötödik lila színnel ábrázolva.



36. ábra. Csapvízen, különböző nagyságú áram alkalmazásával végzett mérések időfüggvényei (fekete, kék: eredeti nagyságú áram, piros: harmadakkora áram, zöld: tizedakkora áram, lila: háromszoros áram)

Látható, hogy még a teljesen azonos körülmények között, egymás után elvégzett mérések eredménye között is van konstans eltérés, de ami érdekesebb, hogy kisebb áram alkalmazása során csökken a lejtése az ellenállás- és kapacitás-idő függvénynek is, ugyanakkor az is látszik, hogy az eredetihez képest tizedakkora áram alkalmazása során (zöld grafikonok) már szemmel láthatóan megnő az időfüggvények szórása, nyilvánvalóan a változatlan nagyságú környezeti zajok zavaró hatása következtében. A mért impedancia-összetevők időbeli csökkenésének okáról elméleti magyarázattal nem rendelkezem.

Sejttenyésztő médium mérésekor a 37. ábrán látható időfüggvényeket kaptam, a mérés paraméterei megegyeznek a csapvíz mérésének paramétereivel: $T = 10$ másodperc, $t_m = 30$ perc, $L = 1$, $f_1 = 4$ kHz, $ave = 4$. Közvetlenül egymás után 4 mérés eredménye látszik az ábrán: az első 3 mérést az eredeti elrendezés szerinti árammal hajtottam végre, míg a negyediket az eredeti áram hatodával: az első mérés kék, a második piros, a harmadik zöld, míg a negyedik fekete színnel van ábrázolva.



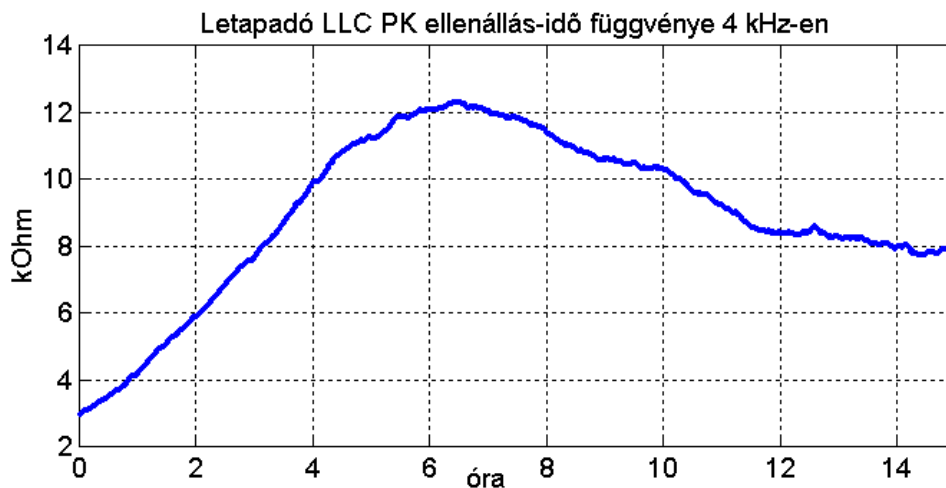
37. ábra. Sejttenyésztő médiumon, különböző nagyságú áram alkalmazásával végzett mérések időfüggvényei (kék, piros, zöld: eredeti nagyságú áram, fekete: hatodakkora áram)

Látszik, hogy itt is fellép a mérés első 5 percében az impedancia-összetevők csökkenése, azonban, eltérően a vízen végrehajtott méréstől, itt mintha az első 5 perc után stabilizálnának a mért ellenállás és kapacitás értékek. A negyedik mérés során (fekete görbék) a kisebb áram hatására a médium esetében is kisebb a kezdeti csökkenés, ugyanakkor a szórás is megnövekszik. A 36. és a 37. ábrák összehasonlításakor szembetűnő, hogy a médium ellenállása jóval kisebb, mint a csapvízé, köszönhetően a benne levő sokkal nagyobb ionkoncentrációnak.

5.3. Mérések sejtrétegen

Primér emberi köldökzsinór-véna endothelsejtből (HUVEC) és sertés vese eredetű epithel sejtvonalból (LLC PK) álló sejtréteget vizsgáltunk, számos mérést végrehajtva. A sejtvonalak rákos, tumoros gén bevitelével úgymond „örökéletűvé” tett sejtek, melyek folyamatosan osztódnak, szemben az ún. primér sejtekkel, melyek 3-4 hétig nőnek, osztódnak, azután kiöregednek, elveszítik jellegzetes tulajdonságaikat.

Frissen az elektródokra leosztott LLC PK tenyészet impedanciáját egyetlen frekvencián, 4 kHz-en mérve a 38. ábrán látható soros ellenállás értékeket kaptuk a 23. ábra szerinti eredeti erősítő-beállításokat használva. (Mivel az irodalomban leginkább a soros ellenállást vizsgálták, az összehasonlíthatóság érdekében mi is csak ezt figyeltük.)



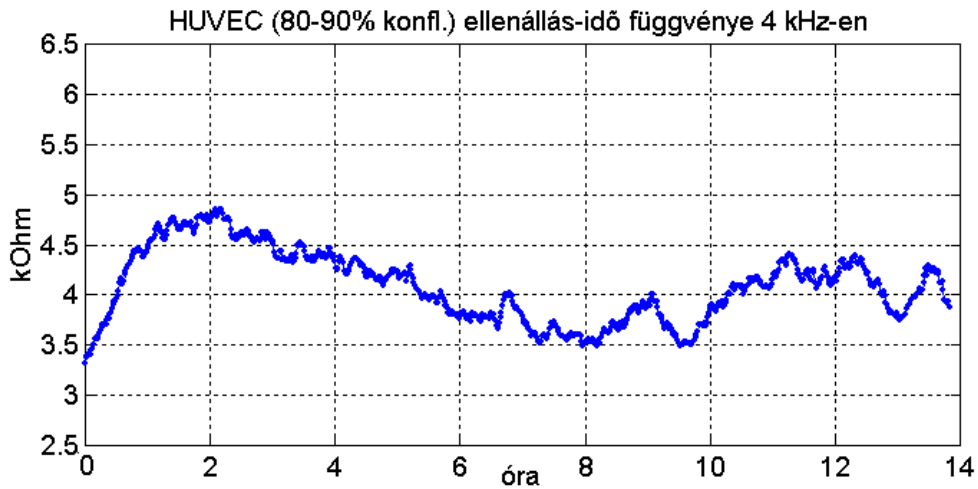
38. ábra. Letapadó LLC PK sejteken végzett mérés eredménye

A mérés eredményéből jól kivehető a sejtréteg kialakulását kísérő ellenállás-növekedés, azonban a kezdeti emelkedés után kialakuló esés oka bizonytalan.

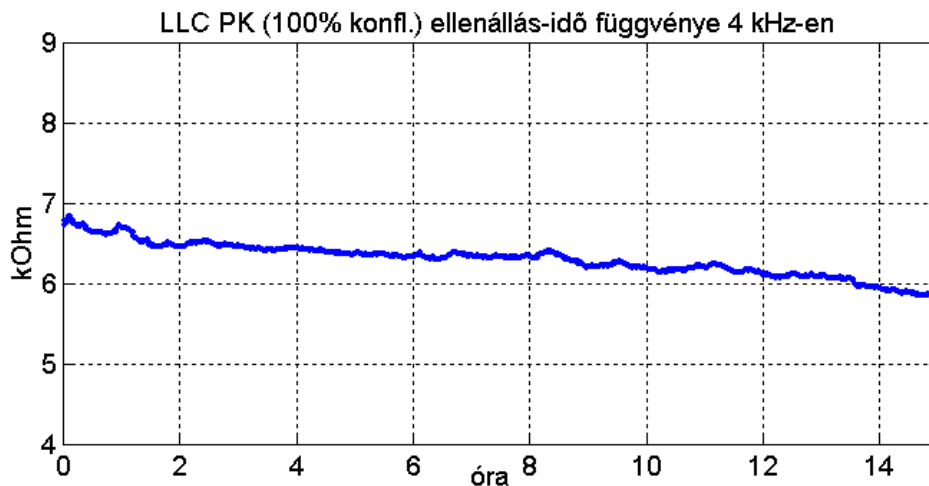
Nyugvó, kezeletlen, mikroszkóppal történt megfigyelés alapján kb. 80%-ban konfluens HUVEC és kb. 100%-ban konfluens LLC PK monolayer impedanciáját 4 kHz-en mérve a 39. és 40. ábrákon látható soros ellenállás időfüggvényeket kaptuk.

A nyugvó, zárt sejtrétegben a sejtek mozgása miatt ugyan fellép ellenállás-ingadozás, de az irodalmi adatokkal összehasonlítva az endothel sejtrétegen mért ellenállás szórása nagy, ennek okára nem sikerült rájönnünk. Az epithelsejtek sokkal zártabb monolayerre képeznek, mint az endothelsejtek, melyek monolayerre kevésbé stabil szerkezetű, dinamikusabb a sejtek mozgása miatt, ami jól látszik a mért eredményeken: az LLC PK monolayer ellenállása nagyobb, az ellenállás ingadozása kisebb, mint a HUVEC monolayeré. Megfigyeltük, ha mérés közben mozgatjuk az

elektródát, az a legtöbb esetben jelentős zavart okoz a mérésben, a mért ellenállás értéke az elektroda mozgásának ideje alatt ugrol.

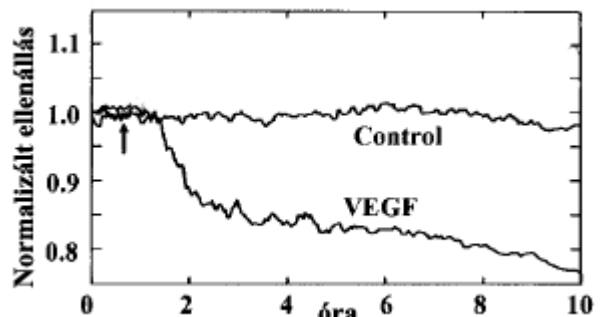


39. ábra. 80%-ban konfluens HUVEC rétegen végzett mérés eredménye

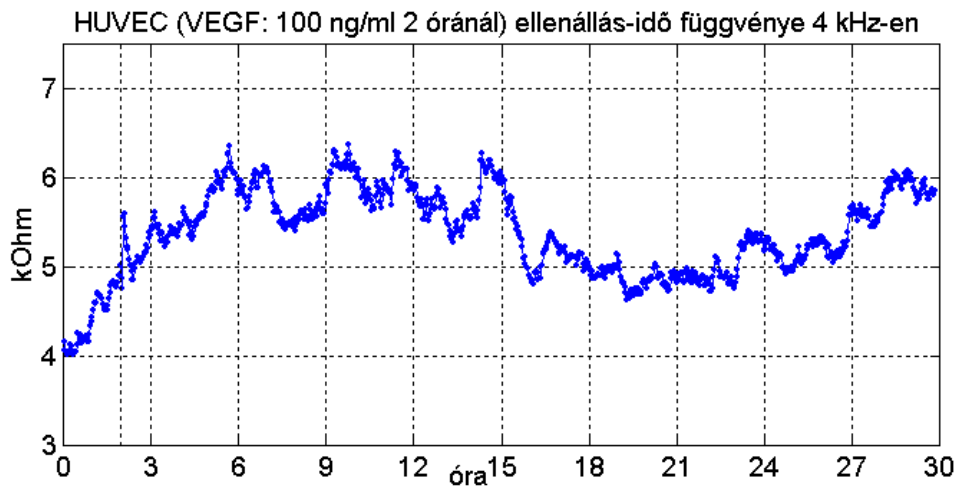


40. ábra. 100%-ban konfluens LLC PK rétegen végzett mérés eredménye

Két anyaggal próbáltuk kezelni a közel konfluens HUVEC monolayer. Előbb ún. vaszkuláris endotheliális növekedési faktorról (VEGF) kezelt HUVEC monolayer ellenállását mértük, melynek a kezelést követően csökkennie kellett volna, ahogyan az az irodalomban [16] is előfordul (41. ábra), ilyet azonban nem tudtuk kimérni: a mérés eredménye a 42. ábrán látható, a kezelést a mérés kezdetét követő második órában végeztük (függőleges szaggatott vonal jelzi).

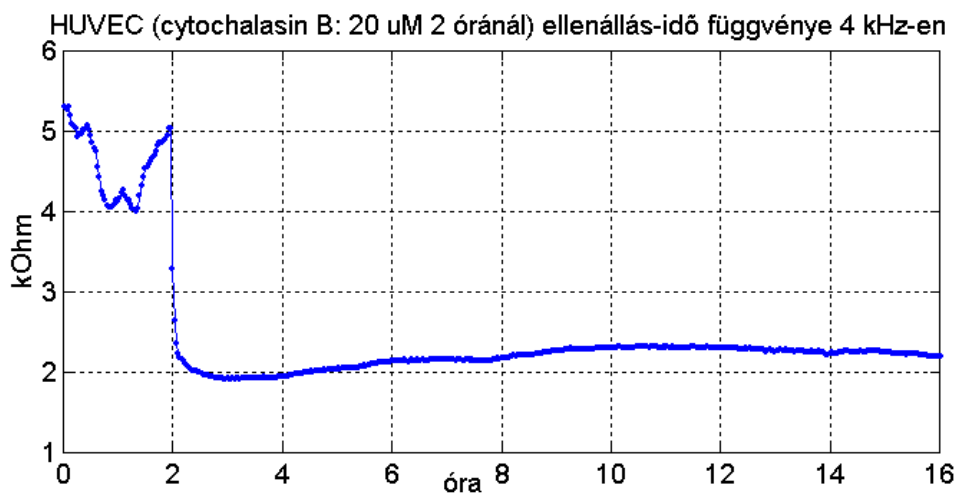


41. ábra. Irodalmi adat VEGF-fel kezelt HUVEC monolayer viselkedéséről [16]



42. ábra. A 2. órában VEGF-fel kezelt HUVEC monolayer ellenállás-idő függvénye

A sikertelenség után egy gombatoxinnal, a cytochalasin B-vel kezeltük a HUVEC monolayeret. A cytochalasinról tudni kell, hogy nagyon radikális anyag, hatására a nagy, elterülő citoplazmájú endothelsejt összehúzódik, csak nyúlványai maradnak, azaz az ellenállásnak itt is le kell esnie. A mérés eredménye a 43. ábrán látható, a kezelést szintén a mérés kezdetét követő második órában végeztük, s jól látszik az azonnali ellenállásesés.



43. ábra. A 2. órában cytochalasin B-vel kezelt HUVEC monolayer ellenállás-idő függvénye

6. Összefoglalás

A diplomatervezés keretében olyan eszköz került megvalósításra, amely konfluens sejtréteg transzcelluláris impedanciáját egyszerre több frekvencián képes mérni és a mért értékeket tárolni. A felmerülő mérés technikai és jelfeldolgozási feladatok indokolták, hogy a mérőrendszer jelfeldolgozó processzort (DSP) tartalmazzon. A DSP-vel felépített mérőrendszerben lehetőség nyílt arra, hogy a rendszer maga generálja a méréshez szükséges gerjesztőjelet is, lehetővé téve a szinkronizált mérést; a mérés végrehajtására a periodikus jelek analíziséhez kifejlesztett, a frekvenciatartományban működő ún. rezonátoros megfigyelő elve került felhasználásra. Az eszköz kezelői felülete PC-n, MATLAB alatt valósult meg: a mérés indítását, a mérés végén a DSP memóriájából a mért adatok felhozatalát, azok megjelenítését MATLAB program végzi.

Az első fejezetben bemutatásra került a sejtbiológiai háttér, különös tekintettel a sejtréteg-permeabilitás változásának okára és a jelenség jelentőségére.

A második fejezetben több sejtrétegpermeabilitás-mérési technika került ismertetésre, közülük az impedancia-méréses technikák rövid története lett részletesebben bemutatva. Az elektród–elektrolit átmenet elektromos modelljének ismertetése után a diplomaterv alapjául szolgáló ECIS technika, és az e módszerrel dokumentált, az irodalomban fellelhető kísérleti eredmények leírása következett.

A harmadik fejezet a rezonátor bázisú generátor–megfigyelő pár elméleti és gyakorlati működését, az impedanciamérés konkrét módját, és a megvalósítandó eszköz műszaki specifikációját ismertette.

A negyedik fejezetben bemutatásra került a felhasznált jelfeldolgozó processzor és az azt tartalmazó fejlesztőrendszer, melyet a rezonátor bázisú generátor–megfigyelő pár elvét alkalmazó, a DSP-re írt program ismertetése és a kezelői felület megvalósító, valamint az impedancia értékét a mért feszültségértékekből kiszámító MATLAB program bemutatása követte. Itt került bemutatásra az elkészített elektróda-befogadó egység is.

Az ötödik fejezetben az elkészült mérőrendszerrel fix elektromos alkatrészekon, csapvízen, sejttenyésztő médiumon és endothel-, valamint epithelsejtrétegen végzett mérések eredményei vannak dokumentálva.

Az eszköz fix alkatrészeken (soros, párhuzamos RC-tagok) kielégítő pontossággal és reprodukálóképességgel működik. A sejtrétegen végzett mérések tapasztalata azonban az, hogy az elkészített mérőrendszer ebben az állapotában még nem felel meg minden elvárásnak, a sejtrétegben bekövetkező finomabb változások biztos detektálására nem alkalmas. Ennek oka valószínűleg az, hogy a mérőrendszer több darabból áll, az analóg részen az összekötő kábelekre sok zaj szuperponálódik, túl hosszúak a hozzávetések és túl sok a kontaktus. A továbbfejlesztés iránya az analóg rész egyetlen kártyára integrálása, mely tartalmazza az erősítőt, valamint vagy elektronikus kapcsolókat a csatornák közötti váltáshoz vagy multiplexereket. Bár egyetlen frekvencián fix alkatrészt mérve a mérőrendszer pontossága megfelelőnek mutatkozott, mégis, a sejtes mérések eredményei alapján a fixpontos DSP helyett egy lebegőpontos rendszer alkalmazása sem elvetendő gondolat.

A SOTE Kóréletteni Intézetével összefogva a BME Méréstechnika és Információs Rendszerek Tanszékén 2005. tavaszán el is indult a fentebb leírt irányelveket figyelembevéve és a jelen diplomaterv egyéb tapasztalataira támaszkodva egy olyan professzionálisabb és célorientált készülék fejlesztése, mely a jövőben hasznos sejtleletteni kutatások eszköze lehet.

Köszönetnyilvánítás

Szeretnék köszönetet mondani konzulensemnek, dr. Sujbert Lászlónak, aki szinte bármikor, sokszor még hétvégén is rendelkezésemre állt konzultáció, illetve a DSP labor biztosítása céljából; aki mindig önálló munkára sarkallt, ugyanakkor gondolatébresztő információkkal segített túllendülni a holtponatokon.

Szeretnék köszönetet mondani külső konzulensemnek, Bodor Csabának, aki szintén maximálisan rugalmasan rendelkezésemre állt, segített megérteni a diplomaterv biológiai hátterét; a témával kapcsolatos, általa fellelt irodalmakat a rendelkezésemre bocsátotta; a sejtes mérések végrehajtását lehetővé tette, azok eredményeinek prezentálásában nagy segítséget nyújtott.

Szeretnék köszönetet mondani dr. Sántha Hunornak, aki ötletet és alapanyagot adott az elektróda-befogadó egység elkészítéséhez.

Irodalomjegyzék

- [1] David A. Borkholder: *Cell based biosensors using microelectrodes*, a dissertation submitted to the Department of Electrical Engineering and the committee on graduate studies of Stanford University in partial fulfillment of the requirements for the degree of Doctor of Philosophy (1998)
- [2] I. Giaever, C. R. Keese: *Monitoring fibroblast behavior in tissue culture with an applied electric field*, Proc. Natl. Acad. Sci., vol 81, pp. 3761-3764 (1984)
- [3] I. Giaever, C. R. Keese: *Use of electric fields to monitor the dynamical aspect of cell behavior in tissue culture*, IEEE Transactions on Biomedical Engineering, BME-33(2), pp. 242-247 (1986)
- [4] C. M. Lo, C. R. Keese, I. Giaever: *Monitoring motion of confluent cells in tissue culture*, Experimental Cell Research, vol 204, pp. 102-109 (1993)
- [5] P. Connolly, P. Clark, J. A. T. Dow, A. S.G. Curtis, R. Lind, C. D. W. Wilkinson: *Extracellular electrodes for monitoring cell cultures*, Institute of Physics Short Meeting Series No. 21 (1989)
- [6] J. Wegener, M. Sieber, H. J. Galla: *Impedance analysis of epithelial and endothelial cell monolayers cultured on gold surfaces*, J. Biochem. Biophys. Methods, vol 32 (3), pp. 151-170 (1996)
- [7] R. Hagedorn, L. Z. Konstanze, E. Richter, J. Hornung, A. Voigt: *Characterization of cell movement by impedance measurements on fibroblasts grown on perforated Si-membranes*, Biochemica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research, vol 1269(3), pp. 221-232 (1995)
- [8] Az Applied BioPhysics Inc. weboldala: <http://www.biophysics.com>
- [9] I. Giaever, C. R. Keese: *Micromotion of mammalian cells measured electrically*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol 88, pp. 7896-7900 (1991)
- [10] J. Wegener, C. R. Keese, I. Giaever: *Electric Cell–Substrate Impedance Sensing (ECIS) as a Noninvasive Means to Monitor the Kinetics of Cell Spreading to Artificial Surfaces*, Experimental Cell Research, vol 259, pp. 158–166 (2000)
- [11] C. Tirupathi, A. B. Malik, P. J. Del Vecchio, C. R. Keese, I. Giaever: *Electrical method for detection of endothelial cell shape change in real time: Assessment of endothelial barrier function*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol 89, pp. 7919-7923 (1992)

- [12] L. Sujbert, G. Péceli, Gy. Simon: *Resonator Based Non-parametric Identification of Linear Systems*, IEEE Instrumentation and Measurement Technology Conference, Budapest, Hungary (2001)
- [13] ADSP-2100 Family User's Manual, Analog Devices, Inc. (1995)
- [14] ADSP-2100 EZ-KIT Lite Reference Manual, Analog Devices, Inc. (1995)
- [15] Jobbágy Ákos: *Segédanyag az Orvosbiológiai mérés technika c. tárgyhoz* (1998)
- [16] J. Chen, F. Braet, S. Brodsky, T. Weinstein, V. Romanov, E. Noiri, M. S. Goligorsky: *VEGF-induced mobilization of caveolae and increase in permeability of endothelial cells*, Am J Physiol Cell Physiol, vol 282, pp. 1053–1063 (2002)
- [17] Technical Documentation of The NEXUS Range of Conditioning Amplifiers Types 2690, 2691, 2692 and 2693