

# Óbudai Egyetem

Doktori (PhD) értekezés térisfüzete



Újfajta mérési módszerek fejlesztése  
idegtudományi kutatások és a  
fogorvostudomány számára  
Orbán Gábor

Témavezető:  
Márton Gergely, PhD

Anyagtudományok és Technológiák Doktori  
Iskola

Budapest, 2021. március 24.

## I. A kutatás előzményei

Az elektrofiziológia a biológiai sejtek és szövetek elektromos tulajdonságainak tanulmányozásával foglalkozó tudományterület. Ezen definíció mentén doktori tanulmányaim során végzett kutatási munkámat két részre lehetne osztani, melyekben a bemutatásra kerülő kutatási projektek alapja az elektrofiziológia. Az első tudományos munka célja az elektrofiziológiai mérési módszerek és egy optikai képalkotó eljárás egyidejű alkalmazás az idegtudományi kutatások területén, melyek központjában az idegsejtek megfigyelése áll. Az elektrofiziológiai jelelvezetés és a kétfoton képalkotás szimultán, azonos szövetterületen történő alkalmazása lehetővé teszi az idegszövet bioelektromos aktivitásának jó időbeli és térbeli felbontásban történő egyidejű megfigyelését [1]. Az implantál mikroelektród-rendszerek alkalmazását összetettebbé és pontosabbá teheti a morfológia háromdimenziós vizsgálata, azonban a képalkotó lézer fotóelektromos műtermékeket hoz létre az elektrofiziológiai jelelvezetés során [2].

A másik bemutatott kutatási terület az emberi fog egyik keményszöve, a dentin vizsgálatához kapcsolódik. A kutatás során meghatározásra került

egy biológiai szövet egyik elektromos paramétere, nevezetesen a humán dentin elektromos impedanciája, valamint annak a geometriai vastagságtól és a mérőfrekvenciától való függése. Az impedanciamérési módszerek alkalmazása lehetővé teszi a fogorvostudományi kutatásokban az emberi fog elektromos paramétereinek meghatározását. Annak ellenére, hogy az impedanciamérés számos orális diagnosztikai eljárás alapját képezi [3, 4], meglehetősen korlátozott számú tanulmány áll rendelkezésre, melyekben a kutatás központjában a humán dentin impedanciájának vizsgálata áll.

## II. Célkitűzések

### Elektrofiziológiai jelelvezetés és kétfoton mikroszkópia egyidejű *in vitro* alkalmazása

Az agyszövetbe ültetett mikroelektród-rendszerek és a kétfoton mikroszkópia egyidejű alkalmazása lehetővé teheti az idegszövet egysejt szintű vizsgálatát nagy időbeli és térbeli felbontásban, azonban a képalkotó lézer műtermékeket hoz létre az elektrofiziológiai felvételekben. A kétfoton képalkotás látómezejében rögzített elektrofiziológiai jelek elemzéséhez a zajterheltség miatt különleges zajsűrű algoritmus fejlesztése szükséges. Kísérleteink során a GCaMP6 genetikailag kódolt kalcium indikátort expresszáló egér agykérgéből készített agyszeleteken *in vitro* kísérletsorozatot terveztünk elvégezni az idegi aktivitás kétfoton mikroszkóppal történő tanulmányozása érdekében, az agyszövetbe implantált mikroelektród-rendszer körül. Kutatásom célja egy összetett, fésűs-sűrű alapú algoritmus fejlesztése volt a képalkotó lézer által generált műtermékek kiküszöbölése érdekében. Az implantált mikroelektród-rendszer körüli morfológia vizsgálatán túl kutatásunk célja volt annak bizonyítása, hogy a sűrűalgoritmus alkalmas lehet egysejt aktivitások detektálására és válogatására

elektrofiziológiai jelelvezetés és kétfoton mikroszkópia egyidejű *in vitro* alkalmazása során.

### **Elektrofiziológiai jelelvezetés és kétfoton mikroszkópia egyidejű *in vivo* alkalmazása**

Az elektrofiziológiai jelelvezetés és kétfoton mikroszkópia egyidejű *in vitro* alkalmazása esetén egysejt aktivitás detektálását és válogatását lehetővé tevő szűrőalgoritmus fejlesztését követően kutatásunk célja a vizsgálatok *in vivo* kísérletekre történő kiterjesztése volt. Fejlesztésre került egy sorozat MEMS technológia alapú mikroelektród-rendszer annak érdekében, hogy egyidejű elektrofiziológiai jelelvezetést és kétfoton képalkotást végezhessünk azonos szövetterületen GCaMP6 genetikailag kódolt kalcium indikátort expresszáló egér agykérgében. Kísérleteink célja a mikroelektród-rendszer kétfoton képalkotás látómezején belül agyszövetbe történő implantálása, majd egyidejű méréssorozat készítése volt. A kísérletsorozat célja a korábban alkalmazott algoritmus továbbfejlesztését követően annak alkalmazhatóságának bizonyítása az extracelluláris adatok elemzése során az egysejt aktivitások detektálásra és válogatására. Kutatásunk célja annak bizonyítása volt, hogy ötvözve az ezen célra fejlesztett

MEMS technológia alapú mikroelektród-rendszert az egyedi fejlesztésű szűrő és elemző algoritmussal az algoritmus lehetővé teszi az egyidejű *in vivo* elektrofiziológiai jelelvezetést és a kétfoton képalkotást azonos szövetterületről.

### **A humán dentin vastagságfüggő elektromos impedancia spektrumának meghatározása**

Az impedanciamérés alkalmazása a fogorvostudományi kutatásokban lehetővé teszi a fog elektromos paramétereinek meghatározását. Habár az impedanciamérés adja számos orális diagnosztikai módszer alapját, meglehetősen korlátozott számú tanulmány áll rendelkezésre, melyekben a kutatás központjában a humán dentin impedanciájának vizsgálata áll. A fogorvostudományi kutatásunk legfőbb célja a humán dentin impedanciájának vastagság és frekvencia függésének vizsgálata volt. Az alkalmazott modellünk lehetővé tette egy együttható meghatározását, amely leírja az összefüggést az emberi dentin vastagságának és elektromos impedanciájának kapcsolata között.

### III. Vizsgálati módszerek

- a) Az egér agyszeletek vibratome segítségével készültek (VT1200s; Leica, Nussloch, Germany) az *in vitro* kísérletekhez.
- b) Az egereket sztereotaxiás keret (David Kopf Instruments, Los Angeles, USA) rögzítette az *in vitro* kísérletek során.
- c) Az idegszövet háromdimenziós vizsgálata kétfoton mikroszkóp alkalmazásával történt (Femtonics Ltd., Budapest, Hungary).
- d) Az idegi aktivitás bioelektromos változásainak elektrofiziológiai rögzítését Intan RHD 2000 erősítő rendszer (Intan Technologies, Los Angeles, USA) biztosította.
- e) Az off-line jelmegjelenítést, szűrést és adatelemzést végző algoritmus Matlab 2017a (MathWorks Inc., Natick, MA, USA) szoftverben került fejlesztésre.
- f) A dentinkorongok elkészítése fogorvosi fűrész (Hofer, Aathal - Seegräben, Switzerland) segítségével történt.

- g) A vizsgált dentinkorongok vastagságának  $10\ \mu\text{m}$  pontossággal történő mérését sztereotaxiás keret (David Kopf Instruments, Los Angeles, USA) biztosította.
- h) A fogászati kísérletek során az impedanciaméréseket Intan RHD 2000 erősítő rendszer (Intan Technologies, Los Angeles, USA) tette lehetővé.
- i) A dentinvastagság-csoportok impedanciáinak statisztikai vizsgálata IBM SPSS Statistics 24 (IBM Corporation, New York, USA) szoftverrel történt.



## IV. Új tudományos eredmények

### Első téziscsoport: Elektrofiziológiai jelelvezetés és kétfoton mikroszkópia egyidejű alkalmazása

**I.a tézis.** Kifejlesztettem egy összetett, fésűs-szűrő alapú algoritmust annak érdekében, hogy adatelemzést hajtson végre elektrofiziológiai jelelvezetés és kétfoton mikroszkópia egyidejű alkalmazása során rögzített adatokon a képalkotó lézer által keltett melléktermékek kiküszöbölését követően. *In vitro* kísérletsorozatot végeztünk GCaMP6 genetikailag kódolt kalcium indikátort expresszáló egér neokortikális agyszeleteken az idegi aktivitás kétfoton mikroszkóppal történő monitorozása céljából. Az idegszövet vizsgálata az abba implantált mikroelektród-rendszer körül történt, amely elektrofiziológiai jelelvezetést végzett az optikai képalkotás vizsgálatával megegyező szövetrégióból. Bebizonyítottam, hogy az alkalmazott szűrőalgoritmus alkalmas a képalkotó lézer által generált periodikus fotóelektromos műtermékek többségének kiküszöbölésére, továbbá hogy az eljárás alkalmas egysejt aktivitás detektálására és válogatására. A tézisponthoz kapcsolódó publikáció: [R1]

**I.b tézis.** A fejlesztett szűrőalgorithmus alkalmaságának további vizsgálata céljából zajszűrését és adatelemzését végeztem elektrofiziológiai jelelvezetés és kétfoton mikroszkópia egyidejű *in vivo* alkalmazására fejlesztett MEMS technológia alapú mikroelektród-rendszer által rögzített elektrofiziológiai adatokon. Az saját fejlesztésű mikroelektród-rendszer alkalmazása lehetővé tette a GCaMP6 genetikailag kódolt kalcium indikátort expresszáló egér agykérgének egyidejű *in vivo* vizsgálatát kétfoton képalkotással és elektrofiziológiai jelelvezetéssel azonos szövetrégióból. Bebizonyítottam, hogy a szűrőalgorithmus alkalmas egysejt aktivitás detektálására és válogatására az egyedi fejlesztésű mikroelektród-rendszer által rögzített, képalkotó lézer által generált fotóelektromos zaj terhelte adatokból. A tézisponthoz kapcsolódó publikáció: [R1]

**Második tézis: A humán dentin vastagság-impedancia együtthatója.** Megvizsgáltam emberi bölcsességfogakból készített dentin korongok impedancia spektrumát a  $0.3 - 2.3 \text{ mm}$  vastagságtartományon annak érdekében, hogy felfedjem a korrelációt a humán dentin vastagsága és elektromos impedanciája között. Az elvégzett *in vitro* kísérletsorozat alapján

meghatároztam a humán dentin vastagság-impedancia együtthatóját, ami:

$$\frac{|Z|}{d}A = 8.356 \Omega m$$

1  $kHz$  mintavételi frekvencián, ahol a mintavétel szórása  $0.605 \Omega m$ ,  $Z$  az abszolút impedancia,  $d$  a dentinréteg vastagsága,  $A$  pedig a vizsgált dentin felülete. A vastagság-impedancia együttható függ a mérési frekvenciától. Az alkalmazott statisztikai módszer bebizonyította hogy a vizsgált mérési frekvenciákon szignifikáns különbségek vannak a kialakított vizsgálati vastagságcsoportok impedanciái között. A tézisponthoz kapcsolódó publikáció: [R2]

## V. Eredmények hasznosítási lehetősége

Az első téziscsoport eredményeinek hasznosítási lehetősége az idegtudományi kutatásokban rejlik. A zajszűrő és adatelemző algoritmus lehetőséget adhat a nagy sűrűségű mikroelektród-rendszerek extracelluláris neurofiziológiai alkalmazásának továbbfejlesztésére az egyidejű kétfoton mikroszkópai képalkotás megvalósításával, és viszont. Az egyidejű, multimodális elvezetések alkalmazása serkentően hathat az új felfedezésekre az idegtudományban és az agy-számítógép interfészek kutatási területén.

Az impedanciamérés számos orális diagnosztikai módszer alapját képezheti, így a második tézispont eredményeinek kiemelt jelentősége lehet a fogorvostudomány számára. A humán dentin vastagság-impedancia együtthatójának meghatározása alkalmas lehet a klinikai fogászatban alkalmazott mérési módszerek továbbfejlesztésére.

## VI. Irodalmi hivatkozások listája

- [1] D. Kuzum, H. Takano, E. Shim, J.C. Reed, H. Juul, A.G. Richardson, J. de Vries, H. Bink, M.A. Dichter, T.H. Lucas, D.A. Coulter, E. Cubukcu, and B. Litt. Transparent and flexible low noise graphene electrodes for simultaneous electrophysiology and neuroimaging. *Nature Communications*, 20(5):5259, 2014.
- [2] Takashi D.Y. Kozai and Alberto L. Vazquez. Photoelectric artefact from optogenetics and imaging on microelectrodes and bioelectronics: new challenges and opportunities. *Journal of Materials Chemistry B*, 3(25):4935–5124, 2015.
- [3] M-CDNJM. Huysmans, C. Longbottom, N.B. Pitts, P. Los, and P.G. Bruce. Impedance Spectroscopy of Teeth with and without Approximal Caries Lesionsan in vitro Study. *Journal of Dental Research*, 75(11):1871–1878, 1996.
- [4] Zhang Xu, Koon GeeNeoh, and Anil Kishen. Monitoring acid-demineralization of human dentine by electrochemical impedance spectroscopy (EIS). *Journal of Dentistry*, 36:1005–1012, 2008.

## VII. Tézispontokhoz kapcsolódó tudományos közlemények

- [R1] Orbán G., Meszéna D., Tasnády K. R., Rózsa B., Ulbert I., Márton G. (2019): Method for spike detection from microelectrode array recordings contaminated by artifacts of simultaneous two-photon imaging, PLOS ONE 14: (8) p. e0221510.
- [R2] Orbán G., Dobó-Nagy Cs., Ulbert I., Márton G. (2020): Thickness dependent electrical impedance spectrum of human dentin, INTERNATIONAL JOURNAL OF CLINICAL DENTISTRY 13: (1) p105-115. 11p.

## VIII. További tudományos közlemények

- [N1] Marek T., Orbán G., Meszéna D., Márton G., Ulbert I., Mészáros G., Keresztes Zs. (2021): Optimization aspects of electrodeposition of photoluminescent conductive polymer layer onto neural microelectrode arrays, MATERIALS CHEMISTRY AND PHYSICS: (260) 124163
- [N2] Márton G., Tóth E. Zs., Wittner L., Fiáth R., Pinke D., Orbán G., Meszéna D., Pál I., Győri E. L., Bereczki Zs., Kandrács Á., K. T. Hofer, Pongrácz A., Ulbert I., Tóth K. (2020): The neural tissue around SU-8 implants: A quantitative in vivo biocompatibility study, MATERIALS SCIENCE AND ENGINEERING: C 112: 110870

- [N3] Zátonyi A., Orbán G., R. Modi, Márton G., Meszéna D., Ulbert I., Pongrácz A., M. Ecker, E. W. Voit, A. Joshi-Imre, Fekete Z. (2019): A softening laminar electrode for recording single unit activity from the rat hippocampus, SCIENTIFIC REPORTS 9: (1) 2321
- [N4] Meszéna D., Kerekes B. P., Pál I., Orbán G., Fiáth R., T. Holzhammer, P. Ruther, Ulbert I., Márton G. (2019): A silicon-based spiky probe providing improved cell accessibility during in vitro slice recordings, SENSORS AND ACTUATORS B-CHEMICAL 297: 126649
- [N5] Márton G., Kiss M., Orbán G., Pongrácz A., Ulbert I. (2015): A polymer-based spiky microelectrode array for electrocorticography, MICROSYSTEM TECHNOLOGIES 21: (3) pp. 619-624.
- [N6] Márton G., Orbán G., Kiss M., Fiáth R., Pongrácz A., Ulbert I. (2015): A Multimodal, SU-8-Platinum - Polyimide Microelectrode Array for Chronic In Vivo Neurophysiology, PLOS ONE 10: (12) e0145307



- [N7] Márton G., Orbán G., Kiss M., Pongrácz A., Ulbert I. (2014): A Novel Polyimide – Platinum – SU-8 Microelectrode Array for Various Electrophysiological Applications, *PROCEDIA ENGINEERING* 87: pp. 380-383.
- [N8] Márton G., Orbán G., Fiáth R., Bakos I., Fekete Z., Pongrácz A., Ulbert I. (2014): MEMS érzékelők a neurofiziológiában, MTA Természettudományi Kutatóközpont Doktori Konferencia, (2014) pp. 56-57.

## **Szabadalmak**

- [P1] Ulbert I., Márton G., Pinke D., Kerekes B. P., Orbán G., Tasnády R. K., Mészéna D. (2017): Ionvezető csatornával ellátott multi-elektrod és alkalmazási eljárása fotoelektromos zaj eliminálására, ügyiratszám, szabadalom benyújtva a Szellemi Tulajdon Nemzeti Hivatala felé, ügyiratszám: P1700527

- [P2] Márton G., Orbán G., Ulbert I. (2015):  
Hajlékony beültetendő eszköz biológiai  
szövetbe való beültetését segítő hordozóeszköz,  
szabadalom megadva a Szellemi Tulajdon  
Nemzeti Hivatala által, ügyiratszám: P1500592
- [P3] Dobó Nagy Cs., Orbán G., Márton G. (2019):  
Dentinvastagság meghatározására szolgáló  
berendezés, szabadalom benyújtva a Szellemi  
Tulajdon Nemzeti Hivatala felé, ügyiratszám:  
U1900110