

其他有利审查文件

A229350868

考生：王思敏

關於研究

我於二下期間進入陳右穎老師的實驗室，並跟著實驗室的學姐進行有關大鼠顱內微電刺激(ICMS, Intracortical microstimulation)的研究。

二下到三上的期間，我主要在實驗室中學習腦部定位與電極植入等手術流程，穩定自己的實驗技術，並學習實驗室內儀器設備與訊號分析軟體的操作。

三上期末我開始正式進行感覺回饋的相關實驗，目前已完成大鼠主要體感覺(S1, Somatosensory I)腦皮質前肢區(體感覺前肢區)的訊號收取、分析，並正在進行大鼠 S1 前肢區之顱內微電刺激實驗，以觀察不同型態刺激下所誘發之 S1 前肢區腦電位的異同，未來擬將運用前兩部分實驗的結果進行感覺回饋應用於外部裝置控制之模型的建立。大三下期末，我也開始了大鼠腦視丘前肢區的訊號收取、分析，並預計於本學期開始視丘內微電刺激的實驗，期望能於本學期末開始利用先前的實驗結果，建立更為精準的體感覺回饋控制模型。

S1 前肢區之 ICMS 相關神經編碼模型與其感覺回饋反應研究

背景介紹

每一天的生活中，意外總是發生在世界的各個角落，車禍、運動傷害、疾病…等，往往對人體造成各種不同的傷害，其中，當這樣的損害發生於中樞或是周邊神經時，便有可能引起體感覺喪失導致當事人生活上的巨變，甚至令當事人暴露於更進一步的危險中。

本研究透過建立顱內微電刺激一體感覺回饋的神經編碼模型(Encoding model)，即是藉由顱內電刺激的技術對主要體感覺皮質區(Somatosensory I, S1)進行刺激以誘發壓力相關的觸覺神經反應，並根據所得觸覺反應之 S1 腦區局部場電位(Local field potential, LFP)型態作為下一次對受試者進行顱內電刺激時的刺激參數，讓受試者能夠針對不同壓力的觸覺感受到不同的觸覺回饋，並期望在未來得以配合機械手臂或壓力感測元件等器材輔助觸覺喪失之患者，能依據感測壓力對患者腦皮質區進行特定型態電刺激，以給予使用者患部感覺回饋。

主要體感覺皮質區(S1, Somatosensory I)為攸關觸壓冷熱痛等體感覺反應的腦區，接收由皮下感覺受器經刺激誘發傳入之視丘之訊號，為視丘之下行層級，然而與視丘(Thalamus)所收取之訊號相比較，由於皮質區進一步把視丘上傳後的訊號進一步處理，因此以 S1 皮質區作為壓力相關腦電訊號的收取區域，有針對特定空間觸覺反應專一性較高與神經反應調性較明顯的優勢。從訊號記錄穩定性的觀點來看，由於腦部局部場電位(LFP)所含括的記錄空間範圍相較棘波(Spike)訊號為廣，因此不易受到在記錄週期中電極些微漂移的影響，我們因此選擇分析 S1 皮質區的 LFP 訊號作為建立 Encoding model 的依據。

研究採用 Wistar 大鼠作為實驗樣本，並將實驗分為四期。

第一期為電極植入與壓桿訓練期，為在後續實驗取得腦電訊號，我們在大鼠 S1 前肢區植入微電極，並對其進行壓感-給水回饋獎勵之學習制約訓練。

第二期為壓桿收訊期，為了分析大鼠 S1 前肢區之壓力相關觸覺訊號，我們藉由壓桿實驗取得大鼠進行壓桿動作時，在碰觸瞬間不同之瞬時加速度(以手部加速度作為壓力參數)下對應至 S1 前肢區所產生之的場電位與棘波訊號，以分析大鼠前肢壓力與 S1 前肢區放電型態的相關性。

第三期為微電刺激實驗期，我們在大鼠要進行壓桿行為前的瞬間對大鼠 S1 前肢區施以微電刺激，此目的在於確認相同前肢加速度下，以不同電刺激電流大小所刺激誘發的腦電位反應，並觀察被施以電刺激後大鼠之行為，以取得後一期實驗的最佳電刺激參數。

第四期為行為驗證期，本期移除在前兩期實驗中所使用的壓桿，在大鼠至前兩期原本放置壓桿之區域空揮前肢時(避免碰觸到壓桿而產生自然觸覺)，對其 S1 前肢區施以微電刺激並觀察大鼠是否產生行為反應，以作為我們的電刺激參數所建立模型是否能給予大鼠觸覺認知之依據。

實驗與材料

實驗共分為四期，第一期為電極植入與壓桿訓練期，第二期為壓桿收訊期，第三期為微電刺激實驗期，第四期為行為驗證期。

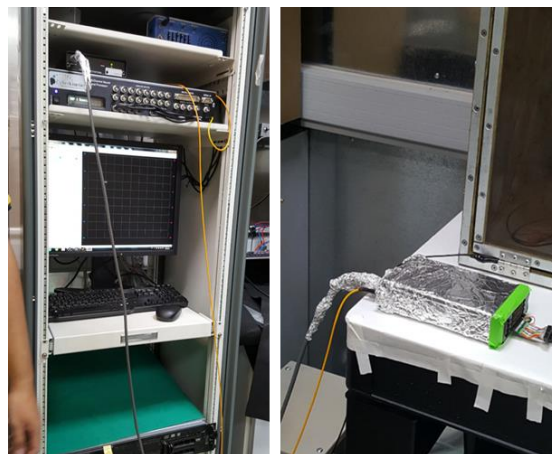
1.電極植入與壓桿訓練:

第一期的電極植入與壓桿訓練實驗目的在藉由在大鼠的體感覺皮質區植入微電極(見圖一)，以取得大鼠腦部電生理資訊以及進行給水獎勵學習制約。

我們採用 Wistar 大鼠 (250g~300g, 雄性) 作為實驗樣本。術前以 1:1 舒泰 (Zoletil 50, 40mg/kg) 混合得麻效 (Dexdomitor, 0.008mg/kg) 肌肉注射麻醉 (0.033ml/100g) 以進行麻醉。開顱手術在移除大鼠囟門 (Bregma) 與人字縫 (Lambdoid suture) 間的毛皮、組織後，於人字縫後小腦上方鎖入接地螺絲，並清除 S1 前肢區上方 (AP:2~-1 mm, ML:1~4.5 mm) 的頭骨與硬腦膜。電極植入部分採用 16 頻道的多通道微陣列電極(材質:304 不鏽鋼；粗細:0.02 英吋；電阻率:17.69 $\mu\Omega$)以進行 S1 訊號收取與 S1 腦電刺激，4 束的四頻道束狀電極中，每束兩根用於收取 S1 腦區訊號，另外兩根電極用於進行 S1 之雙極顱內微電刺激。電極植入後(D:-1.8~-2.4 mm)將電極接地線接上小腦表面接地螺絲。訊號擷取採用 Blackrock CerebusTM 神經訊號資料擷取系統 (取樣頻率: 30kHz；濾波範圍: Spike 250~5000Hz, Continuous 0~5000Hz；Gain: 1000) (見圖二)。實驗時以滴管確認植入位置為前肢反應區。確認完成後以組織膠封住 S1 腦區頭骨開口，並以牙粉固定微電極於大鼠頭部上方。注射得麻效拮抗劑 (Anti-Dexdomitor, 0.033ml/100g) 使動物清醒回復以完成電極植入術流程。於術後 2~3 日復原期後對其壓桿訓練並以給水(由壓桿訊號作動給水器提供)作為壓桿成功的回饋以進行獎勵學習制約(使大鼠學習到當手部有觸壓到桿子，就有水可以喝)。



圖一、植入大鼠 S1 前肢區之微電極



圖二、Blackrock Cerebus™ 神經訊號資料擷取系統

2.壓桿收訊:

第二期的壓桿實驗目的在分析大鼠壓桿瞬間前肢加速度與 S1 前肢區局部場電位(以及棘波訊號)之間的關係(見圖三),收集壓桿誘發之 LFP 訊號的數據以與第三期採用電刺激所誘發之 LFP 作訊號的擬合比對。

(A)實驗設計:

實驗期間,大鼠會於壓克力行為箱中進行壓桿實驗並同時以 Plexon 多通道擷取處理器 (Multichannel Acquisition Processor, MAP) 神經生理系統 (取樣頻率:20kHz; 濾波範圍:Spike 250~5000Hz, LFP 0~5000Hz; Gain:Spike 10000, LFP 1000) 即時記錄其局部場電位 (Local field potential, LFP) 與棘波 (Spike) 訊號,棘波訊號以主成份分析法 (Principle component analysis, PCA) 進行神經特徵分群分類 (Sorting),以取得前肢區高相關性之單位棘波(single unit activity, SUA)訊號 (Sorting 後之 spike 波型分群見圖四)。

壓桿實驗過程中,為了能夠精準抓取樣本前肢碰觸到壓桿的時間點,我們在壓桿上方放置金屬線圈(並以絕緣膠帶隔離避免直接接觸),使因靜電效應產生之電流變化經電阻轉換為電壓訊號。在樣本下壓作動壓桿後,會使給水器內 RC 電路產生壓降而輸出 ttl 訊號,我們經由資料擷取器 (Data acquisition, DAQ) 類比輸入通道記錄上述之觸摸訊號與 ttl 訊號的電壓變化以與 Plexon MAP 記錄之神經訊號作事件時間點比對。

由於 ttl 訊號是由壓桿下壓到一定深度時才產生,因此與樣本觸碰到壓桿的瞬間存在一時間差,故我們同時以兩系統(DAQ, MAP)記錄 ttl 訊號,利用 DAQ 所記錄之觸碰壓桿與作動壓桿的時間差,將 MAP 所記錄之作動壓桿時間校正為觸碰壓桿時間 (MAP ttl - (DAQ ttl - DAQ touch)),以抓取大鼠前肢實際碰觸壓桿瞬間所發生的 S1 LFP 與 spike 訊號, (上述之完整實驗設置與器材見圖五)。

大鼠於壓桿收訊實驗期間之壓桿行為會由 CinePlex 影像擷取器 (擷取頻率:30 張/秒)記錄為 AVI 檔，並將用於後續之壓桿瞬間前肢速度、加速度影像抓點分析(見圖六)。

(B) Spike 與 LFP 訊號分析:

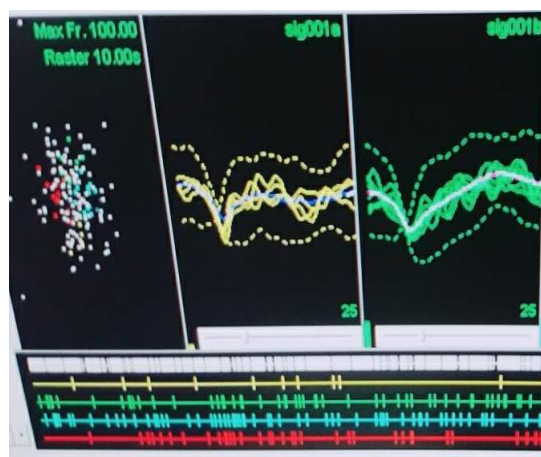
壓桿實驗之訊號主要使用 MATLAB 進行分析，輔以 Offline sorter 與 NeuroExplorer。在校正 Plexon MAP 所收取訊號之時間資料 (MAP ttl – (DAQ ttl – DAQ touch)) 後，以刺激後時間直方圖 (Peri-Stimulus-Time histogram, PSTH) 分析 spike 訊號，觀察刺激後 10 ms ~ 60 ms 內棘波放電頻率是否有顯著上升以作為觸覺刺激是否誘發神經反應的參考基準(見圖七)。

在 LFP 訊號前處理上，會先將訊號經過 5 ~ 150 Hz 的帶通濾波與 60 Hz 的帶阻濾波，再分別使用 2 種不同的分析方法從訊號中分離出雜訊與 LFP:

(a) 獨立成分分析法 (Independent component analysis, ICA)，利用已知為雜訊的通道定義參考雜訊源，從雜訊中分離出 LFP 訊號，(見圖八)。

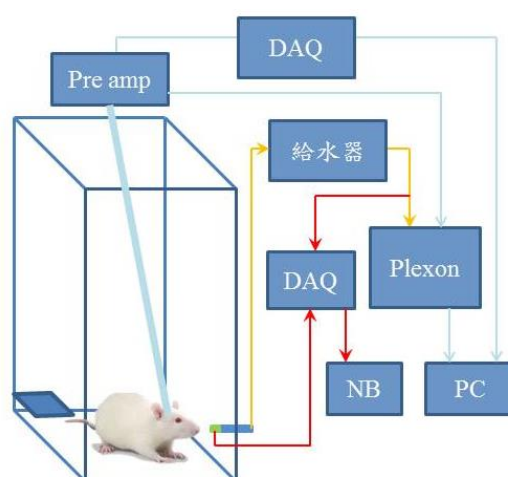
(b) 經驗模態分解法 (Empirical mode decomposition, EMD)，分解出不同時間尺度下之訊號源以去掉雜訊干擾，(見圖九)。

經前二項方法分離掉雜訊干擾後，可以驗出 ICA 分析法能較好的分離出我們需要的 LFP 訊號，接著我們將探討利用 ICA 分析分離出的 S1 前肢區刺激後 LFP 訊號與手部加速度的關係，由於在大鼠前肢受到壓力刺激後 10 ~ 60 ms 的區間內，其腦部 S1 前肢區應會接收刺激後傳入之訊號，並預期可於 LFP 訊號觀察到較大線下面積的高峰或低峰，故我們以 Baseline Area 與 Peak and Valley 方法對 LFP 進行分析(見圖十、十一)，並觀察兩分析法與手部加速度的相關性。

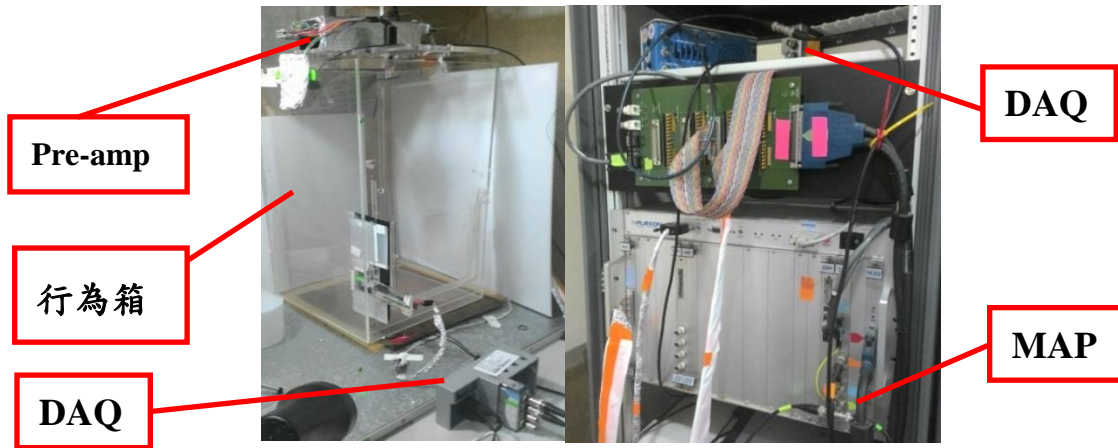


圖四、即時電生理記錄神經反應圖。

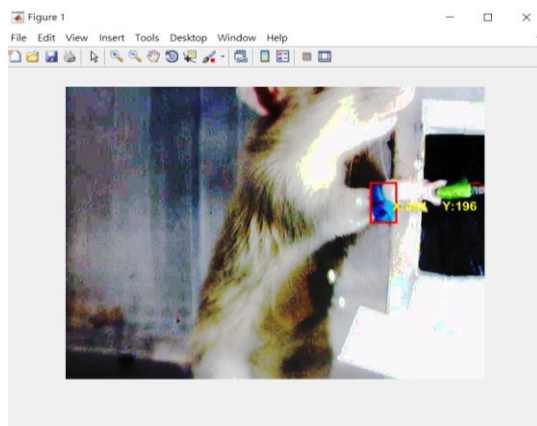
採用 Plexon SortClient 基於主成分分析法將神經訊號作分群。
圖中顯示兩個神經訊號單位。



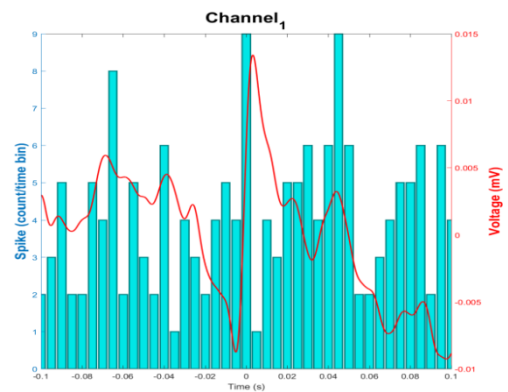
圖五之一、壓桿實驗之硬體設置



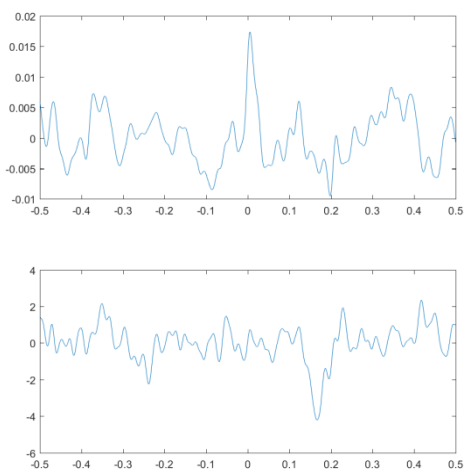
圖五之二、實驗設置儀器(Plexon 系統)



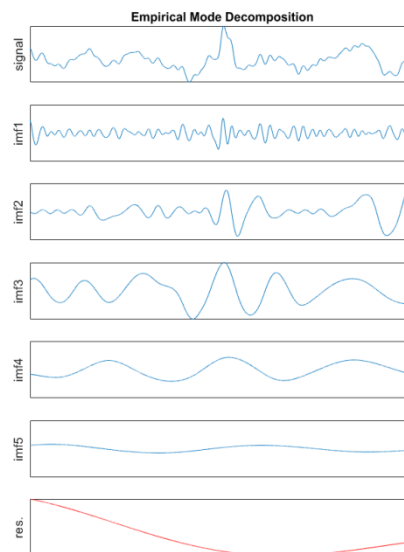
圖六、由 CinePlex 影像擷取器(擷取頻率:30 張/秒)分析手部軌跡，取得壓桿瞬間手部加速度



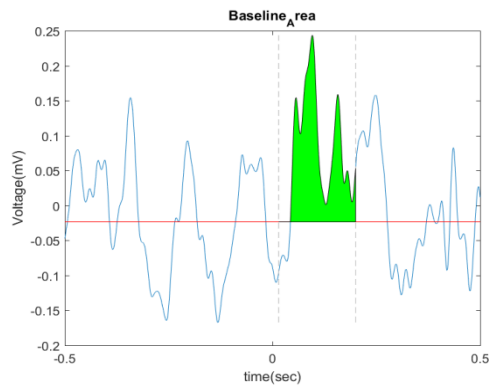
圖七、刺激後時間直方圖(PSTH)分析
刺激後 10 ms ~ 60 ms 區間，
棘波放電頻率增高且密集



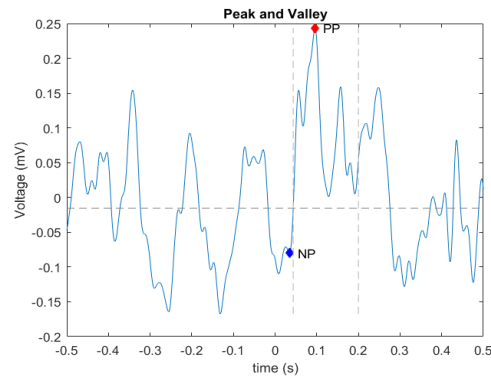
圖八、上圖為原始訊號，下圖為 ICA
分析分離出之訊號，可看出 0 點
因靜電效應產生之雜訊被分離



圖九、原始訊號被分出為多個
不同時間尺度下之訊號



圖十、Baseline Area 分析法取刺激前 50 ms 電位平均值作為基準，得刺激 15 ms ~ 200 ms 基準線以上面積與手部加速度關聯性



圖十一、取刺激後 15 ms ~ 200 ms 區間，取得區間內最大值及最小值，分析其時間差、電位差與手部加速度之關聯性

3.電刺激實驗期:

S1 顱內微電刺激實驗目的在於確認相同前肢加速度下，以不同電刺激電流大小所刺激誘發的腦電位反應，以與第二期採用壓桿所誘發之觸覺神經反應做擬合比對[1]。

使用 {4, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100} μA 為電刺激參數，實驗設置與壓桿實驗相同，但會於大鼠揮動前肢碰到壓桿前的瞬間給予 S1 腦區電刺激，其中每個電刺激參數會進行 30 次試驗（電刺激頻率：1Hz）。此目的在觀察大鼠於不同電刺激參數下產生之 S1 神經反應以及相對之行為，以找出最佳電刺激參數，利於行為驗證期可以最少的試驗次數得到成功的行為反應，同時收集前肢壓力（以加速度表示）相對應神經放電反應的關係，以供後續建立神經編碼模型。

4.行為驗證期:

行為驗證實驗目的在對樣本施以微電刺激並觀察大鼠之行為反應，以作為我們的電刺激參數所建立模型是否能給予大鼠觸覺認知之依據。

實驗期間行為實驗箱內的壓桿將被拆除，當大鼠至前兩期壓桿放置位置空揮前肢時，便以最佳電刺激參數給予大鼠 S1 前肢區微電刺激，並觀察是否於 2 秒內回到水盤找水，若有，則視其為成功的一次試驗（即微電刺激有誘發產生虛擬觸覺反應），並給大鼠水作為回饋，此段實驗期為防止因電刺激造成學習產生之二次制約行為（使老鼠認知到受到電刺激，就能有水喝），應以試驗次數越少為佳。

參考資料:

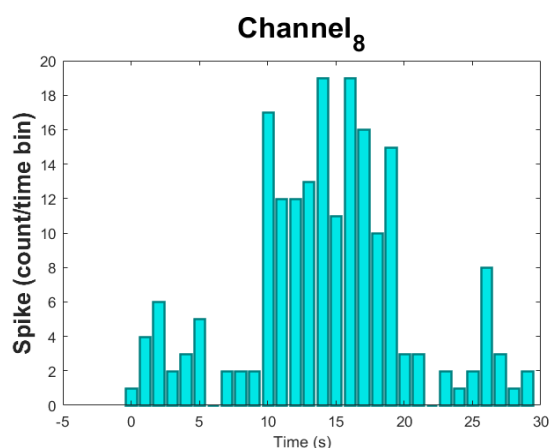
1. Behavioral Demonstration of a Somatosensory Neuroprosthesis, J. A. Berg, J. F. Dammann, 2013

視丘 VPL 前肢區之 ITMS 相關神經編碼模型與其感覺回饋反應研究

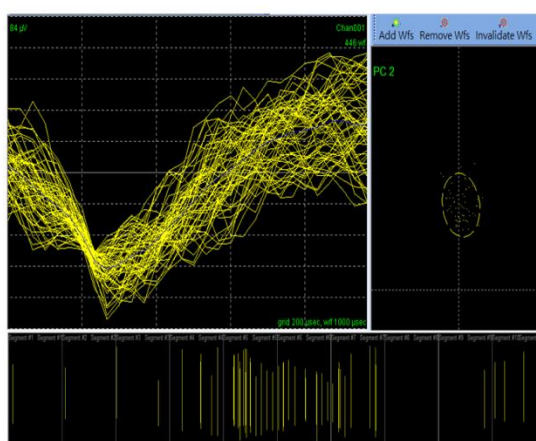
在過去的實驗中，我們發現同時於 S1 進行電刺激與訊號記錄容易造成刺激當下的雜訊干擾而覆蓋掉部分神經訊號。此外，還有誘發並記錄到鄰近腦區反應的可能性，因此我與另一位專題生於三下開始進行視丘腹後側核區 (Thalamus VPL) 的腦區定位與訊號分析。我們發現該位置相較於 S1 腦區訊號較為穩定，且因 VPL 為周邊受器進入中樞神經系統的第一個中繼站，因此方便我們作周邊受器與中樞解剖位置的對應關係，利於之後 ITMS (微電刺激 Thalamus 收取 S1 前肢區訊號) 的建模分析。

腦區定位實驗 (Mapping)

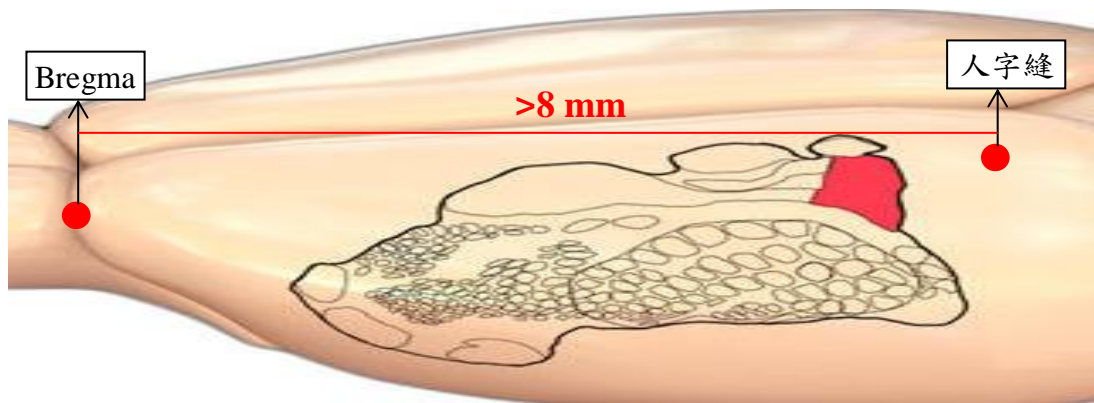
實驗使用 4*1 之束狀電極對 Wistar 大鼠進行 Thalamus VPL 之前肢區定位 (AP: -2.6 ~ -3.8 mm, ML: 2.4 ~ 3.2 mm, D: -5.8 ~ -6.4 mm, [1])，在定位實驗中(N = 6)，我們發現在 ML = 2.8mm, D = -6.0mm 處常為大鼠前肢區反應最明顯亦最具專一性的位置(定位點見圖十四)，下圖十二為其中一個樣本定位之結果，訊號採用 Blackrock Cerebus™ 系統紀錄(見圖十三)，圖示(圖十二)中可見未刺激區間(0 ~ 9 秒；21 ~ 30 秒)與針對前肢給予壓力刺激區間(10 ~ 20 秒)之每秒棘波數，可以看出在 10 ~ 20 秒的刺激區間內大鼠之 Thalamus VPL 前肢區放電反應特別活躍，因此，我們將刺激(10 ~ 20 秒)與未刺激區間(0 ~ 9 秒；21 ~ 30 秒)分為 2 組，分別對此 2 組以一秒為單位進行隨機取樣(N = 30)，將 2 組之每秒棘波數以雙樣本平均數差異 t 檢定(two sample T test)檢測，由下圖十五可見刺激區間之隨機取樣平均放電量與放電區間，相對於未刺激區間呈現顯著增加($p < 0.05$)。



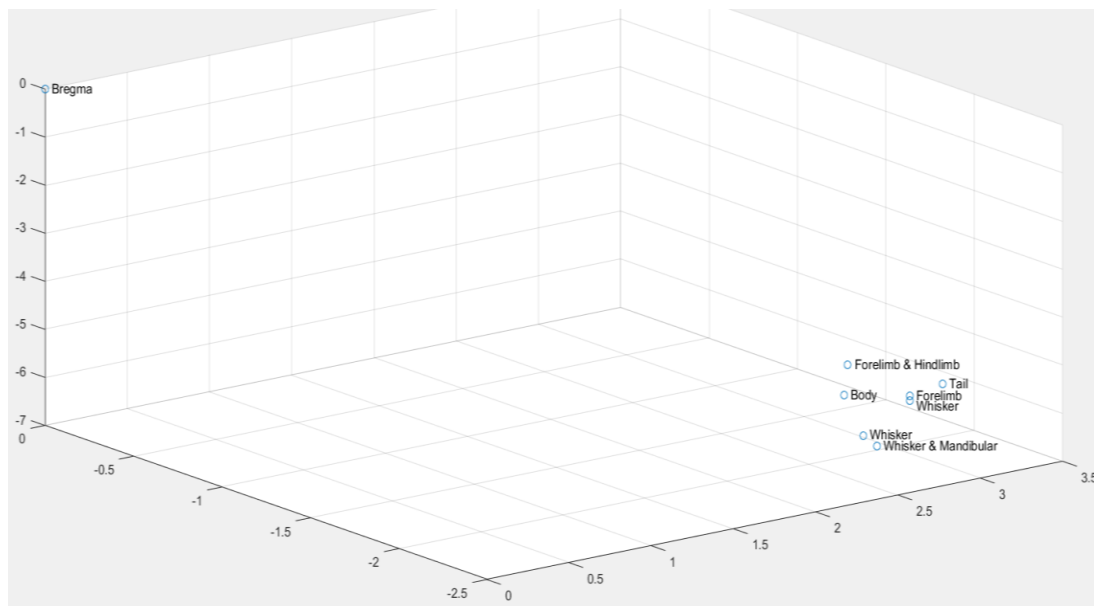
圖十二、Thalamus VPL 前肢區定位
結果—每秒棘波數



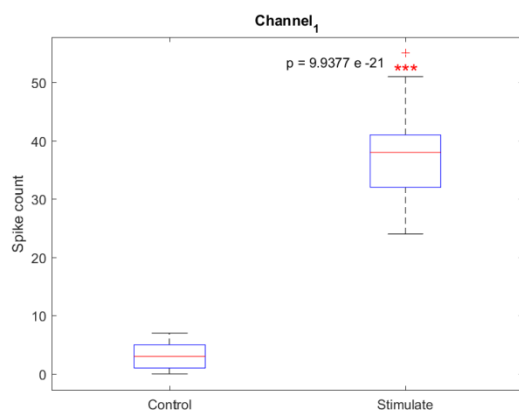
圖十三、Thalamus VPL 前肢區定位
結果—Spike waveform



圖源: <http://www.natgeomedia.com/wp-content/uploads/2016/11/%E8%80%81%E9%BC%A0%E8%85%A6%E9%83%A8%E7%A4%BA%E6%84%8F%E5%9C%96.jpg>



圖十四、Mapping 定位結果，X, Y, Z 三軸單位皆為 mm
(定位點上方圖示為腦部位置參照)



圖十五、未刺激區間(Control)與刺激區間(Stimulate)之隨機取樣(N = 30)平均放電量與放電區間。在刺激區間放電量呈現顯著增加($p < 0.05$)

參考資料:

1. Proprioceptive-and-Cutaneous-Representations-in-the-Rat-Ventral-Posterolateral-Thalamus, Joseph T. Francis, Shaohua Xu, and John K. Chapin1, 2008