

行政院國家科學委員會專題研究計畫 期中進度報告

應用神經影像技術於體外神經元介面之研究(子計畫 三)(1/3)

計畫類別：整合型計畫

計畫編號：NSC92-2218-E-041-005-

執行期間：92年08月01日至93年07月31日

執行單位：嘉南藥理科技大學資訊管理系

計畫主持人：劉育寰

報告類型：精簡報告

處理方式：本計畫可公開查詢

中華民國93年5月31日

行政院國家科學委員會補助專題研究計畫 成果報告
 期中進度報告

應用神經影像技術於體外神經元介面之研究(1/3)

計畫類別： 個別型計畫 整合型計畫

計畫編號：NSC 92-2218-E-041-005-

執行期間：92年8月1日至93年7月31日

計畫主持人：劉育寰

共同主持人：

計畫參與人員：

成果報告類型(依經費核定清單規定繳交)： 精簡報告 完整報告

本成果報告包括以下應繳交之附件：

- 赴國外出差或研習心得報告一份
- 赴大陸地區出差或研習心得報告一份
- 出席國際學術會議心得報告及發表之論文各一份
- 國際合作研究計畫國外研究報告書一份

處理方式：除產學合作研究計畫、提升產業技術及人才培育研究計畫、
列管計畫及下列情形者外，得立即公開查詢

涉及專利或其他智慧財產權， 一年 二年後可公開查詢

執行單位：嘉南藥理科技大學 資訊管理系

中華民國 93 年 5 月 27 日

中文摘要：

本子計畫的主要目的是希望能設計一套光電影像(optical image)系統來擷取神經細胞內與細胞間的鈣離子傳輸(calcium transients)及作用電位(action potentials)傳遞的光電訊號或影像。而神經影像(neuroimage)有別於一般影像的地方，除了它的高時間(temporal)解析度(必要時可高達約 4000 frames s⁻¹)外，主要是神經細胞的電生理(electrophysiology)現象所呈現出來的影像(亦即動作電位與鈣離子傳遞訊號)，而不是一般形態(morphology)的影像。本計畫所開發的光電影像系統是架構在顯微鏡平台上，用來觀察子計畫一所培養出來的神經細胞，並可驗證子計畫二及子計畫四所建構的神經元介面與神經元微電極對神經細胞的電刺激之影響。

在第一年的計畫中主要是希望能建置一套光電影像系統。整個系統的核心部分是在於光電感測器(optical sensor)部分，一般的 CCD sensor 很少具有本計畫所要求的那麼高的時間解析度，而光電二極體陣列(photodiode array)則很難像 CCD sensor 有那麼高的空間(spatial)解析度。還有光電感測器對於不同頻率能量的敏感度亦是本計畫需考慮的重要因素之一。所以，如何克服現有光電感測器的限制而讓本系統能有高時空(spatio-temporal)解析度與高感度，是本計畫一個重要的研究課題。經過審慎的評估與考量，本年度的計畫將先建置一組高速 CCD camera 於倒立式顯微鏡上，同時建立影像擷取介面與個人電腦連線進行高速取像。

英文摘要：

The main goal of this project is to design an optical image acquisition system for catching the signals or images of action potentials and calcium transients in the intracellular and intercellular neurons. The difference between neuroimage and traditional image is, except its high temporal resolution (about 4000 frames s⁻¹), the electrophysiological (i.e. signals of action potentials and calcium transients) but not morphological phenomena of the neurons. The developed optical image acquisition system based on microscope is used for

observing the cultural neuron from subproject 1, and for proving the electrical stimulation effects of the neurons made by the neuron interface (subproject 2) and neuron microelectrodes (subproject 4).

The main goal in the first year is to setup an optical image acquisition system. The core of our system is the optical sensors. The traditional CCD sensor does not have the capability of high temporal resolution as photodiode array, while the photodiode array does not have the capability of high spatial resolution as CCD sensor. Beside, the sensitivity via different frequency is also the major consideration in our project. Thus, overcoming the limitations of the optical sensors to increase the spatio-temporal resolution and the signal sensitivity is the important course in our project.

前言及文獻探討：

神經工程(Neural Engineering or Neuroengineering)乃應用生物醫學工程技術於神經細胞再生與組織特性評估、神經與電子介面及神經系統調控(modulation)等研究及應用。神經工程的主要研究目的在於探討中樞神經系統及周邊神經系統的感覺(sensory)或運動(motor)的控制訊息(command)的活化(activation)、傳遞(propagation)及調節(modulation)過程。而在應用層次上，主要是研究恢復失去或受損的神經功能的方法，其中包含了設計、分析和測試神經細胞及神經系統的再生及修復功能，神經細胞及系統與人造電子系統的功能性介面等。因此才提出以植入式神經元介面為基礎的整體型研究，分別針對神經元介面的製作(子計畫一)、神經元微電極(子計畫二)、神經影像(本子計畫)、神經元-微電極介面(子計畫四)及植入神經元介面後的神經訊號傳導(子計畫五)與動物導航(子計畫六)等相關主題進行深入的探討。而本子計畫則負責神經影像技術的研究，其相關的背景包含神經元介面及相關的影像或光電訊號擷取，茲分述如下：

神經元介面：

神經元介面之研究重點在於探討如何於體外觀察神經元細胞的培養及再生控制，更進一步探討如何將神經元與生物相容性基板(substrate)相結合，將此混合式的神

經元介面植入神經系統(中樞腦部或脊髓神經系統)，使之與原有神經系統之固有組織達到良好的整合狀態，發揮系統原有之功能。神經元介面之研究範圍包含細胞培養、細胞移植、生醫材料工程、微機電製程技術及醫學電子等整合技術。

中樞神經系統(central nervous system)受傷害引發神經損傷斷裂、神經元連結網路(neural network)中斷、神經細胞死亡(neuronal cell death)；而且，成熟的中樞神經系統神經細胞再生的能力很低，無法製造新的神經替補死去的神經細胞，造成神經生理功能修復的困難。因此，如何增進中樞神經系統的再生一直是各種治療策略探討的重點。這些治療策略包括補充神經滋養因子(neurotrophic factors)防止中樞神經系統受傷後神經細胞死亡之擴大^{[1]-[3]}，利用神經束移植(nerve graft)重新連結斷裂之神經組織--主要應用在周邊神經系統及脊髓之修復^{[4]-[6]}，利用細胞移植(cell transplantation)替換失去功能或死亡之神經細胞^{[7]-[9]}。其中細胞移植被認為對中樞神經系統神經修復極具潛力。因此，幹母細胞(stem cells)及神經元母細胞(neuronal progenitors)常是細胞移植的最佳材料。經過相關的評估，子計畫一選擇以神經元母細胞作為移植細胞，雖然神經元母細胞只能取自胚胎且不能大量培養，使得材料取得較不容易，但卻是中樞神經系統再生修復上理想的移植細胞材料。

相關的影像或光電訊號擷取：

作用電位(action potentials)及鈣離子傳遞(calcium transients)通常是研究神經訊號傳導的一個重要指標，在本計畫中將其稱為神經影像(neuroimage)。最常應用的領域是心臟肌肉收縮時的肌電訊號的傳導^{[10]-[12]}，有少部分的研究是著重於神經細胞內^[13]、^[14]與神經細胞間^[15]的神經訊號傳導。而觀察作用電位及鈣離子傳遞的方法通常是將螢光染色劑染在器官表面或細胞上，在某個頻段的激發光源(stimulating light source)照射下，當有動作電位或鈣離子傳遞時螢光染色劑會被激發出某個頻段的發射光(emission light)，然後便可利用光電感測器或 CCD camera 來擷取訊號或影像。而不同的激發光源或不同波段的激發光對不同的染色劑會有不同的發射光。有的使用 RH237 及

Rhod-2 AM 染色劑在 520 ± 20 nm 的激發光下分別產生 >715 nm 及 585 ± 20 nm 的發射光^[10]；而有的使用 di-4-ANEPPS 及 indo 1 染色劑在 515 ± 5 nm 及 365 ± 25 nm 頻段的激發光下，則會產生不同頻段的發射光 >695 nm 及 485 ± 5 nm^[11]；當然還有其他的激發光與染色劑^{[12]-[14]}。在本計畫中將先挑選適合的染色劑，使之能順利的染在神經細胞或神經細胞間質組織上，然後在考慮其動作電位與鈣離子傳遞訊號的可分辨性(distinguishability)。

在擷取神經影像的訊號時必須考量的另一個因素是光電感應器。其實神經影像是螢光染色劑被激發後所發射出的能量，而且會以相當快的速度在細胞內與細胞間傳遞。因此要確實地掌握神經影像，光電感測器的效能是相當重要的。有的文獻使用光電二極體陣列(photodiode array)^{[10]-[12]}，有的則使用高速 CCD camera^[13]、^[14]。當然兩者對於取樣速率(sampling rate)、不同頻段能量的敏感度(sensitivity response)及空間解析度(spatial resolution)均有不同。為了觀察神經影像訊號隨時間變化的情況，建議使用超高取樣速率(4000 frames s⁻¹)的光電二極體。而高速 CCD camera 的取樣速率大致可達 900 frames s⁻¹，則可用來觀察神經影像在神經網路傳導的情形。但就空間解析度而言，兩者的特性正好相反，高速 CCD camera 有較高空間解析度(約 256x256)，而光電二極體陣列在超高取樣速率的條件下只能達到 16x16。還有文獻使用雙光子雷射掃描顯微鏡(two-photon laser-scanning microscope)^[15]或共焦顯微鏡(confocal microscope)^[16]來擷取螢光影像。

整個神經影像擷取系統的建置還需考量其他因素，如光電感測器對於不同頻段能量的敏感度、兩組光電感測器校準(alignment)的問題、訊號-雜訊比(S/N ratio)、類比-數位訊號轉換(A/D conversion)、數位訊號影像化(frame grabber)、電腦程式介面、高速資料擷取與儲存、動作電位與鈣離子傳遞訊號的串音(cross-talk)問題、鈣離子濃度的校正(calibration)等，這些都是本計畫必須探討並加以克服的問題。本系統與一般文獻中所建置的系統之最大不同點，在於本計畫嘗試整合光電二極體陣列、高速 CCD camera 及一

般 CCD camera 所擷取到的訊號與影像，讓系統具有較大的彈性，以適應整體計畫中其他子計畫的需求。而系統建置完成後，對於所擷取到的神經影像與訊號將進行一連串的分析與處理，預期可提供有用的訊息以驗證或配合其他子計畫。所以，在整個整體計畫中，本子計畫雖然只是建立一個神經影像的擷取系統，但卻扮演著相當重要的角色。

研究目的：

光電影像(photo image)擷取系統之建立：

本研究目的希望能設計一套光電影像(photo image)系統來擷取神經細胞內與細胞間的鈣離子傳輸(calcium transients)及作用電位(action potentials)傳遞的光電訊號或影像。整個系統式架構在一台顯微鏡上，包含光學桌、激發光源、光纖、分光鏡、光電二極體陣列(photodiode arrays)或高速 CCD、濾鏡組、光電訊號放大器、高速類比-數位訊號轉換器(A/D converter)、高速高畫質數位影像擷取器、線性陣列光譜儀(linear array spectrophotometer)及個人電腦等設備。本系統的要求是儘量提高系統的時空(spatio-temporal)解析度，以便精確的觀察鈣離子傳輸及作用電位在細胞內與細胞間傳遞的情形。

神經系統的發展與生長之分析：

在神經系統的發展與生長上，細胞外基質 ECM (extracellular matrix) 的醣蛋白(glycoproteins)，細胞膜分子(membrane molecules)及可溶性分子(soluble factor)可調節神經細胞向外發展及成形。一般認為神經細胞較長的向外突出為軸突(數目較少)，訊號多為向外輸出，神經細胞較短的向外突出為樹突(數目較多)，其功能多為接收其他神經細胞訊號，而一個神經細胞是否較有功能，取決於這一個神經細胞是否與其他神經細胞較有 interaction (樹突數目較多為佳)，至於螢光染色就看要針對的物質節決定，較大物質的螢光染色例如對整個細胞或對細胞膜、細胞核螢光染色，較小物質的螢光染色例如對細胞膜上的特定蛋白質、細胞內的特定分子螢光染色。

本計畫將以影像處理技術，針對腦神經細胞的螢光影像或一般影像進行分析、評估與量化神經突的延長分支情況。

研究方法：

架設光電影像(optical image)擷取系統：

整個系統是透過二路或三路的分光器(splitter)與顯微鏡連接，示意圖如 Figure 1 所示。其中兩個光電感測器(optical sensor/detector)分別用來偵測動作電位(action potentials)與鈣離子傳遞(calcium transients)的訊號(在本計畫中稱這樣的訊號為神經影像(neuroimage))。然後經過到電流-電壓(I-V)轉換器、訊號放大器(gain/amplify)、濾波器(filter)及類比-數位訊號多工轉換器(A/D multiplexer)，再透過電腦擷取訊號。必要時還可以透過一般的 CCD/video camera 來擷取神經細胞的型態(morphological)影像，與神經影像做比對，可進一步了解神經影像傳遞的實際情形。

為測試系統的可行性，本年度的計畫擬先使用一組光電感測器，其餘的濾鏡及激發光源則留待第二年計畫來完成。僅透過分光器與顯微鏡連接，用一般的光源擷取光電訊號，可測試光電感測器對不同頻率能量的敏感度(sensitivity)、訊號-雜訊比(S/N ratio)及 A/D multiplexer 的取樣速率。

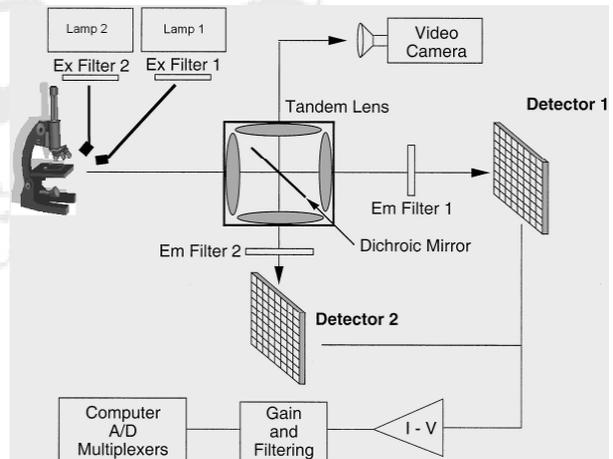


Figure 1 系統架構示意圖

神經細胞影像之分析：

對於樹狀神經突複雜度的評估參數大致有：所有樹狀突的長度(total dendritic length)、中間與末段區段的數量與長度(number and lengths of intermediate and terminal)、路徑長度(pathlengths)、區段的分離度(centrifugal order)、樹狀結構的不對稱指數(tree-asymmetry index)等^[17]。在本計畫中將就吾人的需求對這些參數的可用性進行評估，必要時則另行定義參數以符合吾人的需求。

吾人將以形變差異比較法進行樹狀結構拓樸(如樹狀突及分支)的分析,此法乃改良樹狀突的管狀模型(tubular model)^{[18], [19]}。其特點是從管狀結構模型進行細線化(skeletonization)—可以盡可能的保持細微分支的資訊而不被細線化動作給消除掉;及分支路徑搜尋(branching path finding)動作—可降低樹狀結構的複雜度及提高路徑搜尋的速度。

而影像分割的部分則評估了各種邊界偵測的方法,包括 Sobel、Prewitt、Roberts、Laplacian of Gaussian 及 Canny 等方法。

結果與討論：

光電影像擷取系統之評估與建立：

如前言及文獻探討所提,有的光電影像擷取系統使用光電二極體陣列(photodiode array),有的則使用高速 CCD camera。當然兩者對於取樣速率(sampling rate)、不同頻段能量的敏感度(sensitivity response)及空間解析度(spatial resolution)均有不同。在本年度的計畫中主要是受到經費的限制,只能先建置高速 CCD camera 的取像系統,當然也配合採購速率相當的類比-數位訊號轉換(A/D conversion)、數位訊號影像化(frame grabber)及高速影像擷取的電腦程式介面。建置完成後之光電影像擷取系統架構示意圖應如 Figure 2 所示。



Figure 2 光電影像擷取系統架構示意圖

神經細胞影像之分析：

首先對一般(非螢光)的神經影像做分析,原始影像如 Figure 3 中左上角所示,該影像是取自子計畫一的神經元介面。其中黑色條狀的物體為連接電極的銅線,其餘有類似樹狀結構的則為神經細胞的軸突,是吾人

想要分析的部位。從影像的特性來看,黑色的部分可用區域成長法來分割,只是得手動給定種子點(seed point)。但神經細胞與軸突部分就比較不容易分割,因為其顏色不是很均勻且與背景相當接近,而邊界又有點模糊。基於這些特性,以顏色來分割神經細胞的可行性應比用邊界分割來得小,因此評估了各種邊界偵測法的效果,結果如 Figure 4 所示。

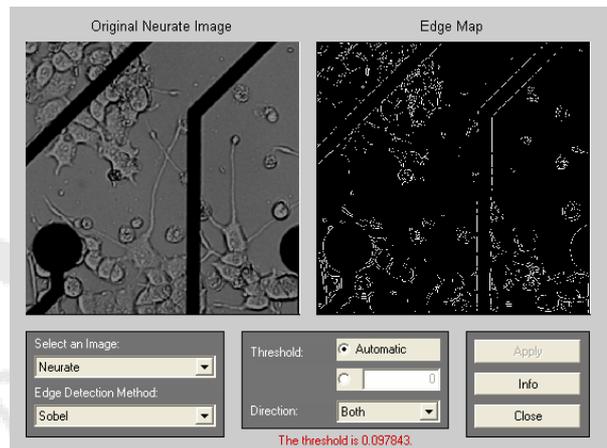


Figure 3 神經影像分析程式介面

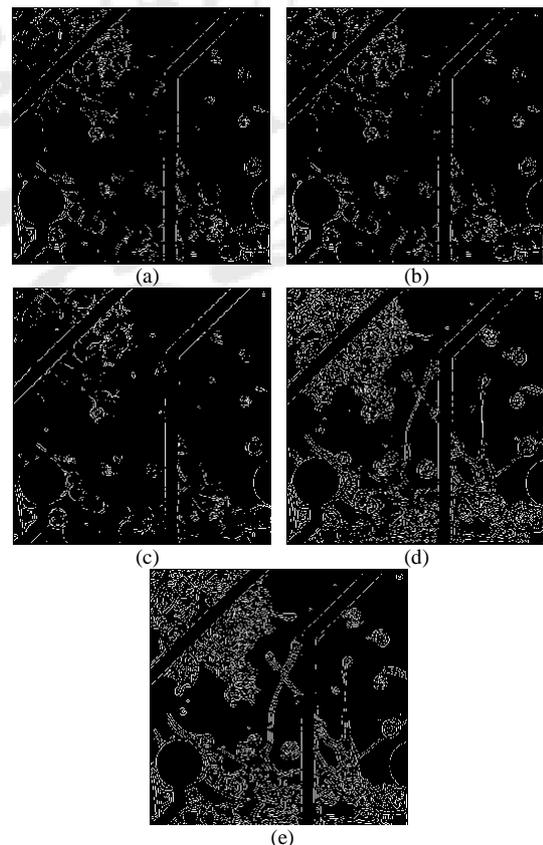


Figure 4 各種邊界偵測的結果, (a) Sobel; (b) Prewitt; (c) Roberts; (d) Laplacian of Gaussian; (e) Canny.

參考文獻：

- [1] Lu, B., Gottschalk, W., 2000, "Modulation of

- hippocampal synaptic transmission and plasticity by neurotrophins,” *Prog. Brain Res.*, 128:231-241.
- [2] Giehl, K.M., 2001, “Trophic dependencies of rodent corticospinal neurons,” *Rev. Neurosci.*, 12:79-94.
- [3] Wang, Y., Chang, C.F., Morales, M., Chiang, Y.H., Hoffer, J., 2002, “Protective effects of glial cell line-derived neurotrophic factor in ischemic brain injury,” *Ann. N Y Acad. Sci.*, 962:423-437.
- [4] Blight, A.R., 2002, “Miracles and molecules--progress in spinal cord repair,” *Nat. Neurosci.*, Suppl:1051-1054.
- [5] Bregman, B.S., Coumans, J.V., Dai, H.N., Kuhn, P.L., Lynskey, J., McAtee, M., Sandhu, F., 2002, “Transplants and neurotrophic factors increase regeneration and recovery of function after spinal cord injury,” *Prog. Brain Res.*, 137:257-273.
- [6] Tuszynski, M.H., Conner, J., Blesch, A., Smith, D., Merrill, D.A., Vahlsing, H.L., 2002, “New strategies in neural repair,” *Prog. Brain Res.*, 138:401-409.
- [7] Weissman, I.L., 2000, “Translating stem and progenitor cell biology to the clinic: barriers and opportunities,” *Science*, 287:1442-1446.
- [8] Arenas, E., 2002, “Stem cells in the treatment of Parkinson's disease,” *Brain Res. Bull.*, 57:795-808.
- [9] Kondziolka, D., Wechsler, L., Achim, C., 2002, “Neural transplantation for stroke,” *J. Clin. Neurosci.*, 9:225-230.
- [10] Choi, B.R., Salama, G., 2000, “Simultaneous map of optical action potentials and calcium transients in guinea-pig hearts: mechanisms underlying concordant alternans,” *J. Physiology*, 529.1:171-188.
- [11] Laurita, K.R., Singal, A., 2001, “Mapping action potentials and calcium transients simultaneously from the intact heart,” *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.*, 280: H2053-H2060.
- [12] Kanai, A., Salama, G., 1995, “Optical Mapping Reveals That Repolarization Spreads Anisotropically and Is Guided by Fiber Orientation in Guinea Pig Hearts,” *Circulation Research*, 77:784-802.
- [13] Colavita, A., Capello, G., Ijaduola, R.B., Cuneo, A., Lagostena, L., Canepari, M., Mammano, F., 1999, “Intracellular gradients of free calcium visualized in sensory and neuronal cells by a high-performance fluorescence imaging system,” *SPIE*, 3604:100-106.
- [14] Canepari, M., Mammano, F., 1999, “Imaging neuronal calcium fluorescence at high spatio-temporal resolution,” *J. of Neuroscience Methods*, 87:1-11.
- [15] Wang, J.W., Denk, W., Flores, J., Gelperin, A., 2001, “Initiation and Propagation of Calcium-Dependent Action Potentials in a Coupled Network of Olfactory Interneurons,” *J. Neurophysiol.*, 85:977-985.
- [16] Callamaras, N., Parker, I., 1999, “Construction of a confocal microscope for real-time x-y and x-z imaging,” *Cell Calcium*, 26(6):271-279.
- [17] Van Pelt, J., Schierwagen, A., Uylings, H. B.M., 2001, “Modeling dendritic morphological complexity of deep layer cat superior colliculus neurons,” *Neurocomputing*, 38-40:403-408.
- [18] Aeschlimann, M., Tettoni, L., 2001, “Biophysical model of axonal pathfinding,” *Neurocomputing*, 38-40:87-92.
- [19] Van Ooyen, A., Graham, B.P., Ramakers, G. J.A., 2001, “Competition for tubulin between growing neurites during development,” *Neurocomputing*, 38-40:73-78.

計畫成果自評：

1. 評估並建立了一套光電影像擷取系統，雖然受限於經費，但仍採購了一套高速 CCD camera 以利後續計畫中對 Ca^{2+} 的螢光影像的擷取。初期先使用現成的軟體進行高速影像的結取，後期再嘗試自行開發取像軟體，以利取像的控制及後續的分析。
2. 對於一般神經細胞影像做了初步的了解與分析，並評估了各種邊界偵測函數的分割效果。雖然自動閾值的設定並無法得到滿意的結果，但至少已將大部分所要的邊界標示出來。後續可以進行閾值的調整，以保留所要的邊界而將多餘的邊界去除。之後可再進行邊界的延續，以嘗試找尋完整的軸突部位。
3. 截至目前為止，計畫的進度應符合要求，只是後續的研究方法仍有待開發。