

Multi-Electrode Array를 이용한 뇌 해마의 Total Activity 추산

이정찬², 김지은², 조정연¹, 손민숙¹, 박경모², 박지호¹

¹경희대학교 동서의학대학원 의과학과

²경희대학교 동서의료공학과

(Received September 23, 2006. November 27, 2006)

Total Activity Estimation of Hippocampal Slice Using Multi-Electrode Array

Jeong-Chan Lee², Ji-Eun Kim², Chung-Yeam Cho¹, Min-Sook Son¹, Kyung-Mo Park², Ji-Ho Park¹

¹Department of Medical Science, Graduate School of East-West Medical Science

²Department of Biomedical Engineering, Kyung Hee University, Korea

Abstract

Research on neural circuit is a difficult area due to complexity and inaccessibility. Due to recent developments, the research using multi-electrode array of cells or tissues has become an important research area. However, there are some difficulties to decode the submerged meaning from huge and complex neural data. Moreover, it needs a harmonic collaboration between informatics and bioscience. In this paper, we have developed a custom-designed signal processing technique for multi-electrode array measured neural responses induced by electrical stimuli to the hippocampal tissue slices of the rat brain.

The raw data from hippocampal slice using the multi-electrode array system were saved in a computer. Then we estimated characteristic points in each channel and calculated the total activity. To estimate the points, we used the Polynomial Fitting Approximation Method. Using the calculated total activity, we could provide the histogram or pseudo-image matrix to help interpretation of results.

Key words : multi-electrode array, brain slice, hippocampus, total activity, polynomial fitting

1. INTRODUCTION

뇌 조직에 대한 연구는 오래 전부터 해부학적, 혹은 분자생물학적 방법을 통하는 것을 기본으로 하며, 염색을 통한 표지 물질을 찾는 등의 방법으로 행해졌다 [1]. 또한 생리적 혹은 기능적 변화를 알아보기 위하여 여러 개의 전극을 *in vitro*나 *in vivo* 상태의 동물 뇌에 부착하여 관찰하는 연구나, 뇌의 조직을 배양하여 전기생리학과 염색을 조합한 연구 등이 진행되어 왔다 [2-5].

뇌 해마를 이용한 연구는 신경과학 분야에서 학습과 기억을 연구하는 대표적인 예로서 위에서 설명한 여러 가지 전통적인 방법을 이용하여 많은 연구가 이루어진 결과 대부분의 뇌 해마 신경회로망에 대한 구조와 연결 관계가 밝혀졌다 [6]. 그러나 전통적인 전기신경생리학적 연구방법이 신호의 크기와 빈도 혹은 전류/전

압의 변화를 이용한 비교적 단순한 분석으로 이루어진 반면에 뇌 해마 신경회로망 전체의 시공간적인 기능 연구는 그 복잡성과 전문적인 하드웨어와 소프트웨어 두 가지 모두를 활용해야 하는 어려움을 갖고 있다 [7]. 이러한 문제를 해결하기 위한 방법의 하나로 multi-electrode array (MEA) 방법이 제시되고 있다 [8]. MEA system과 유사한 기기를 이용한 연구가 점점 확산되고 있는데, 예를 들면, 학습과 기억에 관계되는 long-term potentiation (LTP)에 대한 연구 [9], 신경보호효과 물질을 찾기 위한 시도 [10] 등에 이용되고 있다. 심지어 Steidl 등(2006)은 그들의 리뷰를 통해 MEA system을 이용한 뇌 해마의 기능적, 활동성향을 재조명해 보고 있다 [11].

MEA는 여러 개의 전극을 사용함으로써 뇌 해마의 경우 비교적 해석 가능한 분해능을 갖는 신경회로망의 local field potential 기록이 가능하게 되었다 [2-5]. 그러나 이러한 복잡하고 방대한 전기신호를 생물학적으로 해석하고 의미를 부여하기 위해서는 효율적이며 정밀한 분석방법이 필요하다. 이러한 분석방법이 생물학적 유의성을 갖기 위해서는 적절한 개념을 내포해야 하지만 각각의 실험에 따라 다르게 요구되므로 대부분은 각 연구실에서 개별적

이 연구는 한울진흥재단의 협동연구과제(KRF-2003-042-H00027)와 과학기술부/한국과학재단 우수연구센터육성사업(R11-2002-103)의 지원을 받아 수행하였다.

Corresponding Author : Ji-Ho Park

Tel : +82-31-201-2180

E-mail : jihopark@khu.ac.kr

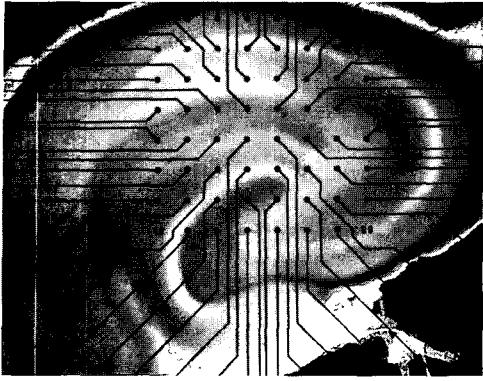


그림 1. 400 μ m의 뇌해마 단편에 60-채널의 MEA를 부착한 모습. 전극간거리: 200 μ m
Fig. 1. Image of attachment of 60-channel multi-electrode array on the hippocampal slice with thickness of 400 μ m. The closest distance of two electrodes is 200 μ m.

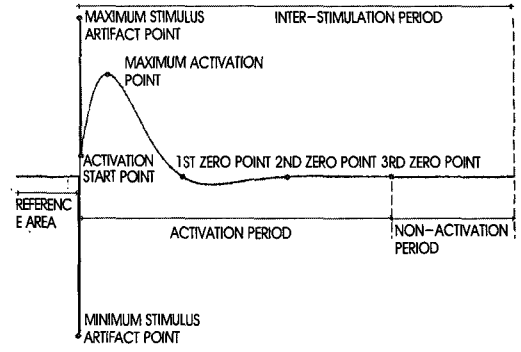


그림 2. 단일 채널의 싱글 스파이크 반응의 간략화한 모델 (임의 단위, 빨간점: 특징점)
Fig. 2. Simplified model of single spike response from one electrode (arbitrary unit, red dots: characteristic points)

으로 맞춤형 분석방법을 개발해야 하는 어려움이 있다.

본 논문은 이와 같은 견지에서 인위적인 외부 자극에 의한 뇌 해마의 activity를 추산하기 위한 지표인 Total activity의 개념과 그에 따른 정확하고 효율적인 맞춤형 data analysis method를 소개하고자 한다. 그 중 중요한 부분은 total activity를 추산하기 위한 특징점을 찾는 방법이며, 본 논문에서는 특징점을 예측하여 total activity를 계산하기 위한 방법으로서 Direct approximation 방법과 Polynomial fitting approximation을 제시하고 각 방법을 비교 평가해 보았다. 그리고 이에 대한 성능을 평가한 이후에 본 논문이 제시한 방법을 실제의 MEA 실험에서 사용한 사례에 대해 설명할 것이다.

II. MATERIALS AND METHODS

A. 뇌 해마에서의 실험

본 논문에서는 MEA를 이용한 실험 방법 중, 쥐의 뇌 해마 단편에 60채널 multi-electrode를 부착하고 (Fig. 1), 특정 영역의 채널을 자극한 후의 response를 이용하여 분석하는 방법을 사용하였다.

뇌 해마의 절편준비는 생리학연구에 보편적으로 쓰이는 방법을 사용하였는데 간략하게 설명하면, 3-5주령 된 쥐에서 빠른 시간 안에 뇌를 적출한 뒤, 조직 손상을 최소화하기 위해서 ice-cold oxygenated (95%O₂, 5%CO₂)된 sucrose-Artificial Cerebrospinal Fluid (ACSF composition in mM: Sucrose, 135; KCl, 3.5; MgCl₂, 1; NaHCO₃, 15; Glucose, 5.5; CaCl₂, 2; HEPES, 10mM) 용액에서 해마를 포함한 뇌의 일부분이 남도록 자른다. Vibroslice (Campden Instruments)를 이용해 400 μ m의 두께로 절편을 내고 이것을 현미경 하에서 해마만 남도록 분리한다. 이렇게 분리된 해마조직을 Artificial Cerebrospinal Fluid (ACSF composition in mM: NaCl, 135; KCl, 3.5; MgCl₂, 1; NaHCO₃,

15; Glucose, 5.5; CaCl₂, 2; HEPES, 10mM) 용액에서 30분에서 한 시간 가량 안정화를 시킨 후 미리 PEI (polyethylene imine, 0.1%)로 coating된 array 올려서 붙인다. MEA본체에 array를 장착한 후 33 $^{\circ}$ C를 유지하면서 oxygenated된 solution을 1분당 2ml 정도씩 흘려주며 자극을 줄 전극을 선택한다.

Oxygenated된 ACSF용액을 흘려주면서, 1시간의 간격을 두고, 152초 동안 연속적인 single pulses (biphasic $\pm 75\mu$ A for 100 μ s each, at an interval of 300ms)를 주면서 6시간 동안 신호의 변화를 계속 육안으로 관찰하면서 Recorder-Rack (MCS, GmbH)를 이용해 자극을 기록한다. 이때 사용한 MEA (8x8 array, inter-electrode distance of 200 μ m, electrode diameter of 30 μ m) system은 'MEA60 (Multi Channel Systems, MCS GmbH)'이다. MEA system에서 발생시킨 stimulus에 의한 해마 단편의 response 중에서, 실제 neuron의 활성화는 stimulus 이후의 response의 면적 값으로 볼 수 있다고 가정하였다. 해마 단편에서의 단일 stimulus의 간략화한 response model은 Fig. 2와 같다.

Reference area는 자극이 인가되기 이전의 neuron의 response가 없는 noise 영역이며, stimulus에 의해 Minimum stimulus point, Maximum stimulus point가 순서대로 유발된다. 그리고 이후 neuron의 실제 신호가 시작되는 부분을 Activation start point라 하였고, 이 이후의 최대 활성지점을 Maximum activation point라고 정하였다. 이후의 response의 크기가 '0 mV'가 되는 세 곳을 차례대로 1st zero point, 2nd zero point, 3rd zero point로 명명하였다. 그 이후의 activation이 관찰되지 않는 부분은 Non-activation period로 명명하여 response가 있다고 생각되는 Activation period와 구분하였으며, 그 기준이 되는 점은 end-point라고 명명하였다.

실제로 neuron의 activation을 나타내는 부분은 Fig. 2의 Activation period이며, 간략화 된 모델에서의 Activation period

내의 신호의 절대값의 총합 (면적)이 response의 activity를 나타내는 것이라고 가정하였다.

B. 신호처리 절차

실험 데이터는 MEA system에 의해 25kHz의 sampling rate로 1회당 152 sec의 실험에 의해 발생된 전체 channel의 response를 기록한 파일을 ASCII 파일로 변환하여 데이터 분석에 이용한다 (Fig. 2, data transform). 데이터 분석은 response로부터 activity를 계산하는 과정과(Fig. 2, data analysis), 결과를 representation하는 visualization부분(Fig. 2, visualization)으로 구성된다.

MEA system에 의해 획득된 뇌 해마 데이터 특성

실제로 얻어진 신호는 Fig. 2에서 간략하게 표현한 모델과는 달리 복잡한 신호의 특성을 가진다. 실제 뇌 해마 단편에서 단일 자극에 의한 특정 채널신호의 frequency response를 살펴보면 white noise가, response signal의 전 영역에 걸쳐 포함되어 있다는 점이다. 따라서 뇌 해마 데이터의 신호처리에 있어서 주파수 영역에서의 접근은 적절하지 않은 것 같다.

C. Direct Approximation Method

Direct Approximation Method는 데이터의 변형 없이 데이터의 특성을 바탕으로 특징점을 계산하고 activity area를 계산하는 방법이다.

Fig. 2에서 제시하는 특징점을 계산하기 위해서 획득된 데이터의 잡음이 백색 잡음의 특성을 보인다는 가정 하에, stimulation의 위치 확인, Reference area의 데이터 특성을 바탕으로 하는 특정 window에서의 moving average 과정을 통한 특징점 검출과 total activity의 계산을 수행한다(Fig. 3).

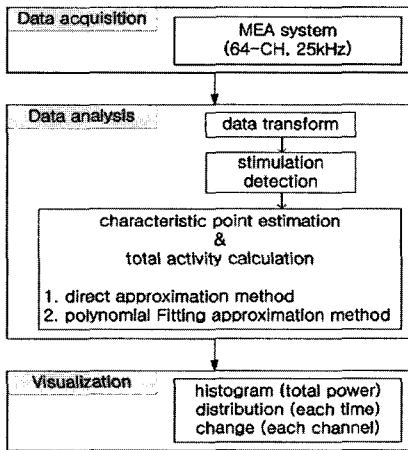


그림 3. 신호처리 절차 (MEA 시스템으로부터 데이터 획득, 제안된 알고리즘을 이용한 분석, 결과의 시각화)

Fig. 3. Signal processing procedure (Data acquisition from MEA system, Data analysis using proposed 'total activity calculation methods', Visualization of the result)

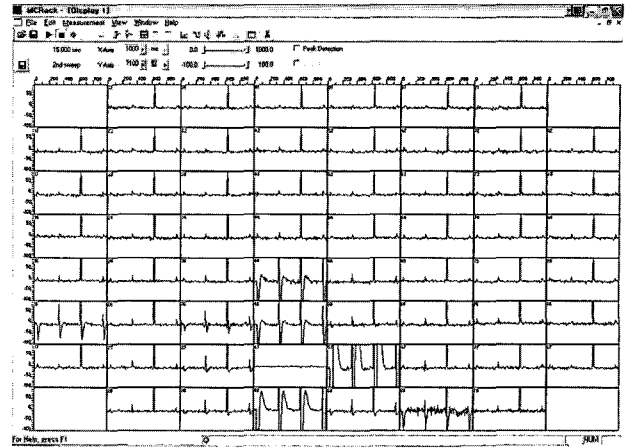


그림 4. 데이터 획득 및 분석 시스템 외관 (MC_Rack, Multi Channel Systems)
Fig. 4. Display of data acquisition and analysis system (MC_Rack, Multi Channel Systems)

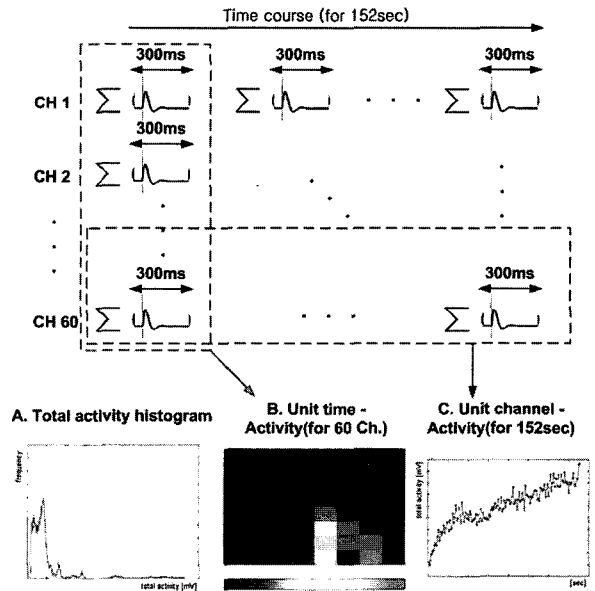


그림 5. 데이터 분석과 시각화 방법의 개념도. (A) 전체 히스토그램, (B) 특정 시간의 활성화도 분포, (C) 단일 채널의 활성화도 변화

Fig. 5. The concept of Data analysis and Visualization methods. (A) Total activity histogram (details in Fig. 11), (B) Unit time Activity (details in Fig. 12), (C) Unit channel Activity (details in Fig. 13)

Stimulation Artifact 검출

일정한 시간간격으로 인가하는 자극은 뉴런의 반응 정도나 세포와 전극의 부착 상태 등에 의해 간혹 비정상적인 형태 (maximum stimulus artifact point가 시간의 흐름에 따라 일정한 값을 갖지 않음)를 보이기도 하지만, 데이터의 잡음으로 인해 불명확한 특징점 검출을 위한 좋은 지표로 사용할 수 있다. Stimulation artifact (minimum stimulation artifact point; 시간의 흐름에 따라 일정

한 값을 갖는다.)는 단순히 문턱값을 제시하여 검출하며, 문턱값은 뉴런의 activation 정도에 영향을 받지 않는 음의 값으로 제시한다 (Fig. 6).

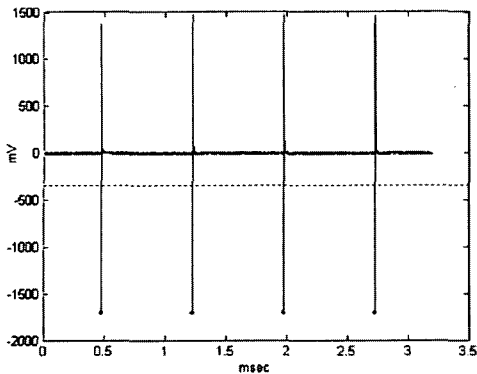


그림 6. 자극신호의 검출(자극신호의 최소값 빨간점, 역차: 검은 파선)
 Fig. 6. Detected normal stimulation artifacts (Minimum stimulus artifact point: red dot, Threshold: black horizontal dash line)

Activity Area Calculation

Fig. 7의 순서로 activity area를 계산하며, 구체적인 내용은 아래에서 자세히 설명하도록 하겠다.

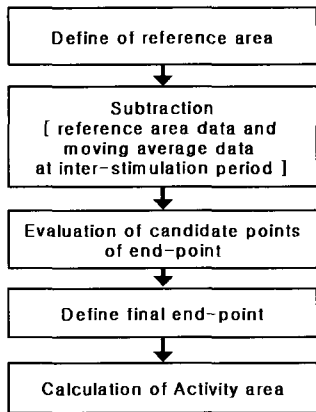


그림 7. 활성도 면적 계산과정
 Fig. 7. The procedure of activity area calculation

특징점 검출의 기본적 개념은 반응이 종료되는 end-point는 반응이 발생하기 전의 상태로 되돌아 오는 지점으로 정의한다는 것이다. 따라서 reference area의 특성을 정의하여 inter-stimulation period에서 서로 가장 비슷한 지점을 end-point로 정의하여 검출한다.

첫 번째, reference area를 stimulation artifact 이전의 40msec로 취하여 필요한 정보를 참조하고, 두 번째 inter stimulation period의 600번째 (의미 있는 신호가 포함될 만한 충분한 길이의 데이터 0~0.024 sec)까지의 데이터를 4msec의 window 크기로

moving averaging을 수행한 후, reference area의 평균값과의 차로 재구성 한다. 재구성된 데이터는 Fig. 9에서 청색 라인으로 표현된다. 위에서 reference의 특성을 관찰하기 위해 설정한 40msec와 잡음을 제거하기 위한 moving window의 크기로 제안한 4msec등의 값은 경험적으로 얻어진 결과이다.

이때 데이터에 존재하는 여러 종류의 잡음은 moving averaging 결과에 오류를 발생시킨다. 또한 이러한 잡음은 무작위로 발생하고 그크기도 다양하여 정량적인 방법으로 구분하기가 힘들기 때문에 end-point를 검출하기 전에 잡음의 유무를 판단하는 것이 필요하다.

두 번째, 잡음의 유무는 activity period의 데이터와 non-activity area의 데이터의 평균값을 비교하여 평가할 수 있다. activity period에 비하여 non-activity area의 데이터의 평균값이 "0"에 가깝다는 특징을 이용하는데, activity period의 평균값이 non activity area의 평균값의 1.3배 (경험값)보다 작으면 잡음이 존재하는 데이터로 평가한다.

평가 결과 잡음이 존재하면 특정 index를 출력하여 발생 시간과 채널의 정보를 저장하여 후처리 과정에서 보정하게 되고 잡음이 존재하지 않는 데이터는 '0'에 가까운 2개의 문턱값을 취해 1차로 candidate points를 정의 후 (Fig. 8. upper), noise level (reference area의 표준편차 값의 1.3배, 경험치)을 문턱값으로 제시하여 2차로 평가하여 정의한다 (Fig. 8. lower). 이때 noise level의 정보는 reference area에서 참조하여 사용한다. 이것이 세 번째 후보점 검출 단계이다.

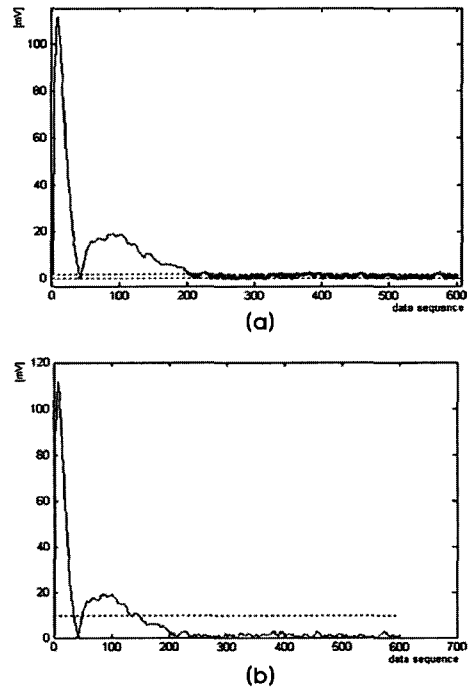


그림 8. 특징점의 후보(윗 그림, 빨간점)와 최종적으로 결정된 특징점(아랫 그림, 빨간점)
 Fig. 8. The candidates of characteristic point(upper, red dots) and finally selected characteristic points(lower, red dots)

네 번째 단계는 총 2차 평가로 정의된 candidate points를 원본 데이터로 옮겨가 end-point를 결정하는 것이다. 이때 원본 데이터의 절대값의 크기를 reference area의 noise 크기와 비교하고, stimulation artifact에서 candidate point까지의 시간을 고려하여 정의한다.

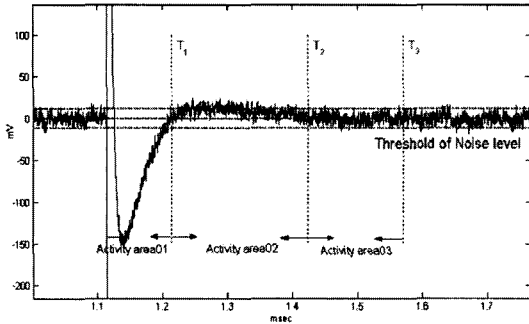


그림 9. Direct Approximation Method를 이용하여 결정된 지표
Fig. 9. The parameters, which define the end-point using Direct Approximate Method

Fig. 9의 붉은 점으로 표시된 부분이 1st~3rd zero point이다. 붉은 점선은 reference area의 특성으로 정의된 문턱값으로 각 zero point간 activity area는 이 문턱값을 넘어야 유효한 response로 인정한다. 또한 특정한 시간이 경과한 후에 정의되는 유효한 zero point는 정상적인 response를 반영하지 않는다고 하여, end-point로 정의하지 않는다. 최종적으로 정의된 3rd zero point는 end-point가 된다.

마지막 단계는 검출된 end-point까지를 total activity로 간주하여 reference area의 평균값을 기준으로 trajectory (궤적)가 만들어 내는 영역의 면적을 계산한다. 이 과정이 direct approximation method에서 total activity를 계산하는 방식이다. 계산을 위한 activity period는 stimulation artifact가 끝나는 지점 (검출된 stimulation artifact point+10μsec; 경험치)에서 activity의 end-point까지의 면적으로 계산한다. 이때의 면적은 각 구간별 절대값의 합 (면적)으로 아래의 식 (1)과 같이 계산하였다.

$$Total_Activity = abs(\sum Activity_area01) + abs(\sum Activity_area02) + abs(\sum Activity_area03) \quad (1)$$

하지만, 잡음 신호의 평균이 0이라 하더라도, 각각의 값이 0이 아닌 값을 가지고 있기 때문에, activation period 영역 내에서의 전체 신호의 합은 잡음의 값들을 반영하게 되어 임의의 큰 값을 갖게 된다.

D. Polynomial Fitting Approximation Method

Polynomial fitting approximation method 방법은, 3.3.1의 direct approximation method에서 사용한 Stimulation Artifact

Detection방법과 동일한 방법을 통해 신호 내에서의 stimulation의 위치를 판단하여 activity area를 계산한다. Direct Approximation Method와 다른 점은 특징점을 추출하고, activity area를 계산하는 방법이다.

데이터 내에서의 Polynomial Fitting Method의 적용범위 (Fitting Range)

Stimulation artifact detection을 통해 자극 시작 시간을 확인한 후, 실제로 polynomial fitting을 통해 polynomial fitting curve를 만들기 위한 데이터의 범위를 정해주는 일이 필요하다. Stimulation artifact가 전부 포함된 inter-stimulation period에서의 polynomial fitting은 Stimulation artifact에 의해 fitting curve가 데이터를 만족스럽게 대표하지 못하며, 실제로 activation area의 계산 측면에서도 stimulation artifact는 원하지 않는 부분 이므로 inter-stimulation period내에서 stimulation artifact영역을 제외한 부분에서의 polynomial fitting이 적절하다. 경험적으로 stimulation artifact가 끝나는 곳은 Direct Approximation Method에서의 값과 같은 'stimulation artifact point 이후 10μ sec (30 data samples)'이다.

따라서 Polynomial Fitting Approximation이 적용될 범위는 inter-stimulation period중 'stimulation artifact point + 30 samples'부터 'stimulation artifact point + 700 samples'이고, 이때 '700 samples'의 값은 MEA의 자극 간격 (300 msec; sampling rate: 25000 samples/ 1 sec)을 고려한 값이다.

특징점 추출 방법

Polynomial Fitting Approximation Method가 적용될 범위가 정해진 데이터를 대상으로 10차의 polynomial fitting이 적용된다. 데이터를 분석하는데 사용한 polynomial curve의 차수는 경험적으로 10차로 하였다. 이보다 차수가 낮으면 주어진 신호를 제대로 반영하지 못하며, 더 클 경우에는 계산시간도 오래 걸리고 noise에 영향을 받는다.

Polynomial Fitting Curve의 해 (zero value point)들을 통하여 원하는 특징점들을 얻어낼 수 있다. 즉 Polynomial Fitting Curve에서의 다항식의 근들이 end-point의 후보점이 되며, polynomial fitting curve의 derivate의 근은 신호에서의 각 peak들의 위치를 나타내는 후보점 들이 된다. 이러한 여러 개의 특징점 후보들 중에서 각 zero-points를 찾는 방법은 positive한 근을 크기 순서대로 (중근은 하나로 계산) 나열한 것 중 1st zero-point는 stimulation artifact point에서부터 300samples 이내에는 존재할 수 없다는 경험치를 적용하여 1st~3rd zero-point를 선택한다. Peak points는 실제 activity area를 계산하는데 필요한 parameter는 아니지만, polynomial fitting curve의 특성을 나타내는 특징점이므로 계산하였다. 각 Peak points는 각 zero-points간에 하나씩 존재하기 때문에 계산된 zero-points의 위치를 고려하여 계산한다.

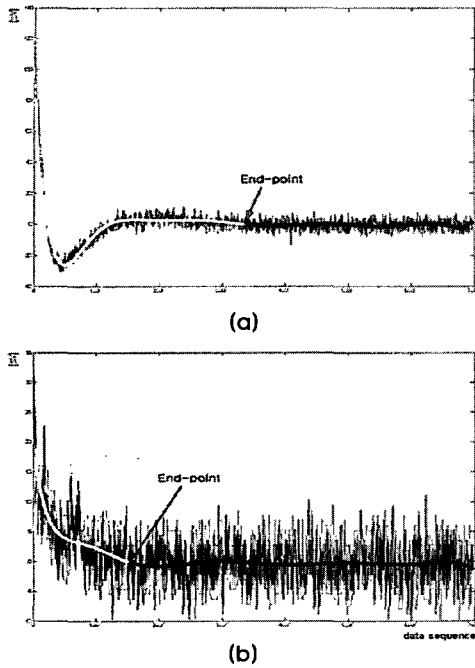


그림 10. 활성화된 신호의 크기에 따른 특징점 결정. 큰 활성화 신호 (위)와 작은 활성화 신호 (아래). (파란선: hippocampal response, 노란선:(Activation Period 내)다차적합곡선, 검은선:(Activation Period 내)다차적합곡선

Fig. 10. Characteristic Point Detection according to the activation amplitude. High activation response (upper) and low activation response (lower). (Blue line: original hippocampal data in fitting range, Yellow line or Black line: polynomial fitting curve and especially yellow line means 'Activation Period')

Activation 정도에 따른 End-Point 선정

경험적으로 polynomial fitting curve의 최대값이 90mV 이상이면 hippocampal activation 정도가 커서 3rd zero-point까지의 정보가 의미있는 것이라는 판단아래 end-point를 3rd zero-point로, 최대값이 그 이하이면 hippocampal activation의 정도가 작아서 1st zero-point이후로는 의미 없는 데이터라는 이유로 end-point를 1st zero-point로 택한다.

Fig.10.은 실제 hippocampal output signal(blue-line), polynomial fitting curve (black-line)와 end-point까지의 polynomial fitting curve (yellow-line)을 나타내며, 그 중 Fig. 10.upper는 activation이 커서 3rd zero-point를 end-point로 정한 그림이며, Fig.10. lower는 activation이 작아서 1st zero-point를 end-point로 정한 그림이다. 각 그림에서의 amplitude의 단위는 mV이며, 두 경우의 amplitude값들을 주의 깊게 살펴보면 비교해볼 수 있다. 참고로 신호의 마지막 부분에서 polynomial fitting curve (black line)가 fluctuation하는 것은 실제 신호는 일정한 값(0 mV)으로 수렴하는 부분에서까지 10차의 polynomial fitting을 적용하기 때문에 생기는 것과, 실제 신호가 fluctuation이 있는 경우이다.

Activity Area Calculation

Activity는 fitting range내의 polynomial fitting curve의 절대값의 합으로 계산하였다. 참고로, Direct approximation method에서의 activity는 (white) noise가 포함된 신호자체의 구간별 합을 바탕으로 계산하였다 (2.2.2절).

실제로 획득하게 되는 일반적인 신호의 특성은 아래와 같이 나타낼 수 있다(여기서, Detected(t)는 실제로 관찰된 값을, Signal(t)은 관찰값 중 의미있는 값을, Noise(t)는 관찰값 중 의미 없는 값을 의미한다).

$$Detected(t) = Signal(t) + Noise(t) \tag{2}$$

우리가 뇌 해마 단편의 activation 정도를 표현하기 위해 제안한 지표인 Total Activity는 아래와 같은 식으로 표현 가능하다(적분 구간 IS는 'inter-stimulation period'를 의미한다).

$$Total_Activity = \int_{IS} Detected(t)dt = \int_{IS} Signal(t)dt + \int_{IS} Noise(t)dt \tag{3}$$

또한, 본 논문에서는 아래와 같이 가정하였다 (적분구간 AP는 'activation period'를, nAP는 'non-activation period'를 의미한다).

$$a. \int_{IS} Signal(t)dt = \int_{AP} Signal(t)dt + \int_{nAP} Signal(t)dt \tag{4}$$

$$b. \int_{nAP} Signal(t)dt = 0 \tag{5}$$

$$c. \int_{IS} Noise(t)dt = 0 \tag{6}$$

위의 가정들에 의해 최종적으로 Total Activity는 아래 식과 같이 표현할 수 있고 실제 가정했던 total activity의 의미와 같다. 이때, 실제로 적분구간 AP내의 적분에 사용한 Signal(t)는 10차 polynomial fitting curve에 의해 충분히 설명된다고 가정하고 Signal(t)와 polynomial fitting curve는 동일한 것으로 간주하였다. 따라서 Polynomial Fitting Approximation Method에서의 total activity값은 polynomial fitting curve의 AP구간 내의 적분값으로 계산한다.

$$Total_Activity = \int_{AP} Signal(t)dt \tag{7}$$

따라서 polynomial fitting curve가 뇌 해마 신호를 충분히 반영하는 지표라면 구간 AP 내에서의 Noise(t)인 'Detected(t) Signal(t)'의 적분값이 0이어야 하고, 구간 nAP내에서의 Signal(t)의 적분값이 0이어야 한다. 그리고 구간 AP와 nAP에서의 Noise(t)는 같은 성질 (same standard deviation)을 가져야 한다. 이에 대해서는 3.2절에서 검증하도록 하겠다.

E. Result Presentation

이 절에서는 계산된 total activity 값을 바탕으로 실험의 분석과 해석이 쉽도록 결과를 presentation 하는 방법에 대하여 Normalization, Histogram, Visualization의 순서로 자세히 설명하겠다.

Normalization

이 단계는 Histogram이나 Visualization 단계를 위한 전처리의 성격을 가진다. Normalization에서 사용하는 방법은 크게 세 가지인데, 전체 면적데이터의 분포도를 바탕으로 하위 1%와 상위 99%사이의 데이터를 바탕으로 수행하며, 첫 번째는 모든 자료의 평균과 표준편차를 계산하여 z-value (sample mean / standard deviation)를 구하고 그 값을 바탕으로 전체의 값을 변환한다. 두 번째는 전체 데이터에서의 최소값과 최대값을 구하여, 각각 0과 1로 변환하며 나머지 데이터 역시 변환한다. 셋째로는 데이터를 변환하지 않고 처리하는 것이다.

데이터의 normalization은 단일 실험 내에서의 데이터의 변화를 보기 위한 경우나, 여러 실험의 데이터를 서로 비교하기 위한 경우 등에 수행된다.

Histogram

이 단계는 total activity 데이터들의 빈도를 보여 주기 위한 것으로, 각각의 단일 실험들의 것이나 여러 실험들의 것을 제공한다 (Fig. 11). 이를 통해 실험에 의한 total activity의 변화 양상을 비교할 수 있다.

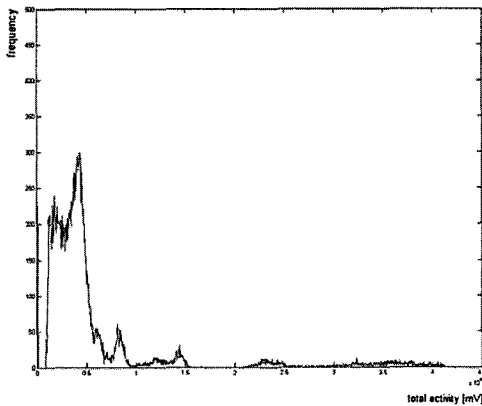


그림 11. 임의 실험의 히스토그램 분석 결과 (예)
 Fig. 11. Histogram of arbitrary experiment (example)

Visualization

Visualization은 total activity의 직관적인 단서들을 제공한다. 하나는 특정시간에서의 채널 별 activity를 나타내고, 다른 하나는 특정 채널에서의 시간 별 activity를 나타낸다. 전자는 각 채널의 활성도를 pseudo color를 이용하여 채널 사이의 activation 정도를 파악할 수 있도록 하였고 (Fig. 12), 후자는 시간의 흐름에 따른 activation의 변화 양상을 살필 수 있도록 하였다 (Fig. 13).

분석 단계에서는 사용자의 요구에 따라 1초에서 152초 사이의 임의의 (또는 연속적인 등간격의) 8x8 pseudo image를 제공하며, 각 채널의 시간에 따른 변화양상의 그래프도 제공한다 (Fig. 13의 예는 특정 채널에서 시간이 흐를수록 total activity가 증가하는 경우).

III. RESULTS

이곳에서는 앞에서 특징점(end-point)을 검출하고, total activity를 계산하기 위해 제안된 두 알고리즘을 각각의 성격에 맞추어 평가하였다.

A. Direct Approximation Method 평가

Direct Approximation Method의 end-point는 문턱값에 의해 최종 정의 된다. 여기서 결정된 end-point는 total activity를 추산하는데 기준이 되는 지점이므로, 제안한 방법이 실제로 정확하게 end-point를 예측하는지에 대하여, 다음의 5개의 경험값으로 120개의 조합을 형성하여 80개의 response로 구성된 10개의 실험데이터를 대상으로 평가하였다. 비교를 위한 실험데이터의 정답(end-point의 위치)은 전문가에 의해 평가되어 구성되었다.

- 1) reference data의 상, 하한값
- 2) moving average의 window 크기
- 3) 후보점의 1차 평가를 위한 문턱값
- 4) 후보점의 2차 평가를 위한 문턱값
- 5) 잡음 수준

평가된 결과는 Fig. 14와 같으며 정답과 일치율이 가장 높은 조합을 선택하여 알고리즘을 최종 구성하였다.

최종 구성된 경험값의 조합으로 동일한 실험데이터에 대한 평가 결과는 평균 85%, 표준편차 14% 일치율을 보인다 (Fig. 15). 각 일치율의 표준편차가 큰 이유는 전극의 부착 불량이나 약물처리로 인한 뇌 해마의 비 정상적인 반응이 수 있으며, 정답으로 제시된 데이터의 비정상적인 주관적 평가를 들 수 있다.

B. Polynomial Fitting Approximation Method 평가

Polynomial fitting curve를 통하여 실제 뇌 해마 신호를 근사하는 것이 적절한 방법인가에 대하여 평가해 보았다. 만약 polynomial fitting curve가 뇌 해마 신호를 충분히 반영하는 지표라면 2.3.4절에서 언급한 바와 같이,

Condition,

- (1) 구간 AP 내에서의 Noise(t)인 'Detected(t) Signal(t)'의 적분값이 0이어야 하고,
- (2) 구간 nAP내에서의 Signal(t)의 적분값이 0이어야 한다.
- (3) 그리고 구간 AP와 nAP에서의 Noise(t)는 같은 성질(same standard deviation)을 가져야 한다.

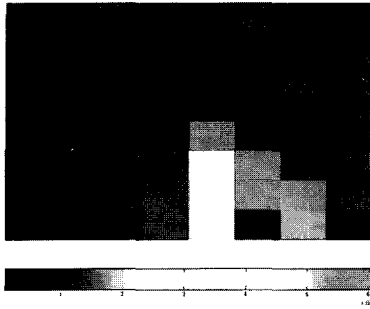


그림 12. 특정 시간의 활성화 분포
Fig. 12. Activity distribution for a time of interest. 8x8 pseudo-color image matrix of unit time activity

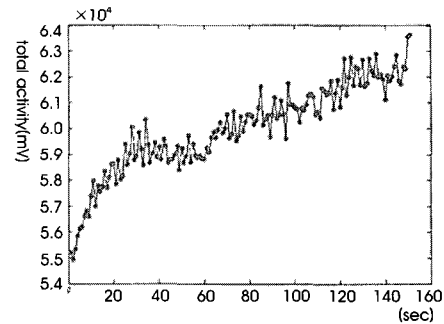


그림 13. 특정 채널의 활성화 변화
Fig. 13. Activity change for a channel of interest

가정과 같이 Fitting curve가 뇌 해마 신호를 충분히 반영하게 된다면, condition (1)의 평균과 condition (2)의 평균은 0이 될 것이며, condition (3)의 상관도는 1이 될 것이다. 하지만 그렇지 못할 경우 즉, fitting curve가 제대로 된 신호를 반영하지 못하거나, 의미가 있는 신호가 포함된 한계라고 생각하는 특징점 이후에서도 의미있는 신호가 포함되어 있음을 의미한다.

임의로 선택된 12case (152sec / 1case, 60channel / 1sec, 3 total activity value / 1 channel)에서의 각각의 평가 결과는 Table. 1과 같다.

표 1. 다차적합의 결과 평가
Table 1. Evaluation of Polynomial fitting

	Calculated value	Ideal value
Condition(1) - mean	0.29 ± 0.74	0
Condition(2) - mean	-0.22 ± 0.11	0
Condition(3) - correlation of std.	0.76 ± 0.21	1

지금까지, 본 논문에서 제안한 '특징점 검출 및 total activity 계산'을 위해 제안된 두 알고리즘을 각각의 기준에 따라 평가하였다. 위의 알고리즘들 중 더 나은 것을 택하기 위하여, 알고리즘의 특성을 고찰하였다 (3.1).

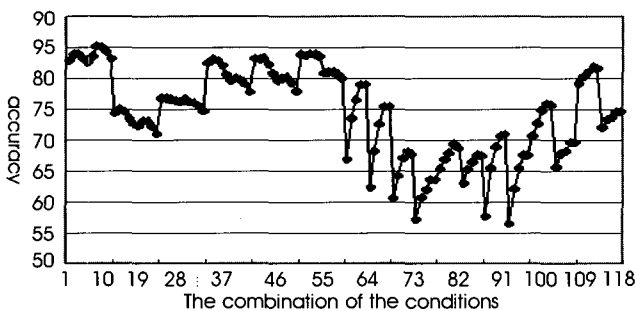


그림 14. 역치의 경우의 조합에 대한 평가 결과
Fig. 14. Result of the evaluation of threshold decision of each combination of conditions

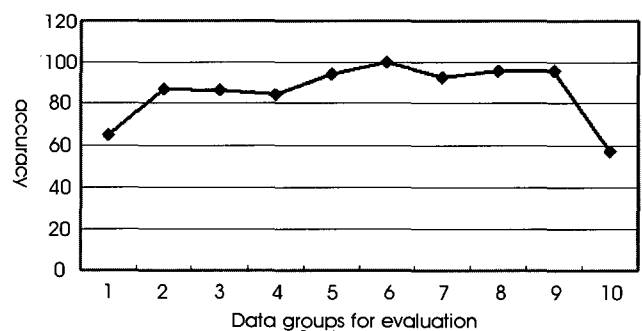


그림 15. 결정된 역치를 이용한 10개군의 평가 결과
Fig. 15. Result of evaluation on 10 data groups using finally decided threshold

IV. DISCUSSION

A. 두 개의 방법의 분석 및 토론

두 가지 분석 방법의 결과는 직관적 (시각적)으로 만족스럽게 특징점 (end-point)을 찾아주고 (Fig. 9, Fig. 10), 정량적으로도 (3. Results)만족스러운 결과를 보였다. 하지만 각각의 분석방법은 각각의 분석 알고리즘에 기인하는 몇 가지 차이점을 보인다.

Direct approximation method에 의한 분석은 잡음 데이터를 반영한다는 장점이 있기는 하지만, 계산량이 많고 시간이 오래 걸리며 (152초의 1회 실험 분석시간: 약 2시간, 간혹 신호(혹은 잡음)의 종류에 따라 에러가 발생하는 경우가 있다. 하지만 Polynomial fitting approximation method는 계산량이 적고, 특징점을 계산하는 시간이 적게 걸리며 (152초의 1회 실험 분석시간: 약 1시간 이내), 잡음이나 신호에 관계없이 동작한다. 따라서 실험 분석의 용이함 등의 측면에서 Polynomial fitting approximation method의 방법이 보다 적절한 방법인 것 같다. 하지만 그럼에도 불구하고 분석시간이 크게 개선되지 않은 이유는, 1회의 실험에서 발생하는 데이터 (약 27000개의 response)가 상당히 많기 때문이다.

B. 실험에의 응용

본 실험에서 제안한 특징점 검출 알고리즘 중 Polynomial Fitting

Approximation Method를 이용하여, stress hormone의 일종인 synthetic glucocorticoid hormone인 Dexamethasone을 처리해서 control과 비교해 보았다. Dexamethasone이 해마에 미치는 영향은 이미 보고된 대로[12], 해마의 CA3부분에 많은 손상을 가져오는 것으로 알려져 있다. 따라서 우리는 CA3부분의 손상으로 인해 해마의 기능적인 면에서도 변화를 가져오는 지에 대한 연구를 수행하기로 했다. 그 결과, Control에서는 2시간에서 5시간 사이 매우 안정적인 신호의 양상을 보인데 반하여, Dexamethasone 처리 후에는 처리 직후부터 CA3부분에서 특이적으로 신호가 증가됨을 보았고, 처리한 지 약 세 시간이 흐르자 신호가 극대화되는 현상을 볼 수 있었다. 위의 결과로 보아 CA3의 손상으로 인해 excitotoxicity가 일어나는 과정에 있음을 알 수 있었다.

뇌 해마의 excitotoxicity에 의한 cell death의 작용을 하는 Dexamethasone 약물처리 후 뇌 해마 단편의 response가 커져 변화가 뚜렷한 treatment case의 결과는 Fig. 16과 같다.

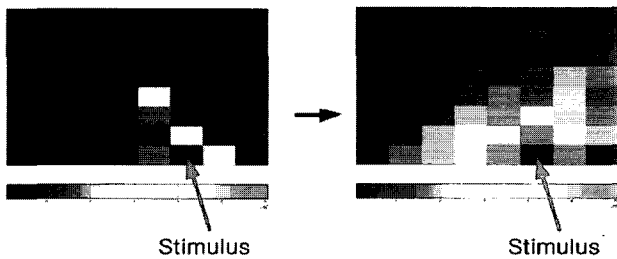


그림 16. Dexamethasone처리 전과 후의 활성화 변화
 Fig. 16. Activity change for treatment (before and after Dexamethasone treatment)

V. CONCLUSION

본 논문에서는 MEA system을 이용한 뇌 해마 실험과 그 신호 처리에 대하여 다루었다. MEA system에서 얻어진 대규모의 데이터를 처리하는 과정에 대하여 언급하였으며, 데이터로부터 total activity를 계산하는 두 가지 분석방법에 대하여 소개하였고, 평가하였다. 뇌 해마 데이터에서 특징점을 찾아내는 과정의 white noise에 대해서는 polynomial fitting method가 원 신호를 충분히 반영하면서도 빠른 시간 내에 에러 없이 동작하는 적절한 방법인 것으로 여겨진다.

본 연구를 바탕으로, 이후에는 MEA system에 의한 외부 자극에 기인한 activation을 관찰하는 것 이외에, 뇌 해마에서의 뉴런의 자발적인 신호원의 위치나 개수 등을 예측하는 일이나, 뇌 해마 slice의 특정 지점에 자극 pulse를 인가한 후 획득한 신호의 response시간을 근거로 single spike에 의한 transmission tracking을 통하여 뇌 해마 상에서의 neuron의 배치나 분포, 전달 경로 등을 예측할 수 있는 정보를 얻을 수 있을 것으로 기대된다.

REFERENCES

- [1] De Ryck M, Reempts JV, Borgers M, Wauquier A, Janssen PAJ, "Photochemical stroke model; flunarizine prevents sensorimotor deficits after neocortical infarcts in rats," *Stroke*, vol. 20, pp.1383-1390, 1989.
- [2] Ferrer I, Lopez E, Blanco R, Rivera R, Ballabriga J, Pozas E, Marti E, "Bcl-2, Bax, and Bcl-x expression in the CA1 area of the hippocampus following transient forebrain ischemia in the adult gerbil," *Exp. Brain Res.*, vol. 121, pp. 167-173, 1998.
- [3] Ray AM, Owen DE, Evans ML, Davis JB, Benham CD, "Caspase inhibitors are functionally neuroprotective against oxygen glucosedeprivation induced CA1 death in rat organotypic hippocampus slice," *Brain Res.*, vol. 867, pp.62-69, 2000.
- [4] Martin P, Berthoz A, "Development of spatial firing in the hippocampus of young rats," *Hippocampus*, vol. 12, pp.465-480, 2002.
- [5] Shimono K, Baudry M, Panchenko V, Taketani M, "Chronic multichannel recordings from organotypic hippocampal slice cultures: protection from excitotoxic effects of NMDA by non-competitive NMDA antagonists," *J. Neurosci. Methods*, vol. 120, pp.193-202, 2002.
- [6] Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM, *Principles of neural science (4th)*, New York, USA, McGraw-Hill, 2000.
- [7] Shimono, K, Brucher F, Granger R, Lynch G, Taketani M, "Origins and distribution of cholinergically induced β rhythms in hippocampal slices," *J. Neurosci.*, vol. 20, pp.8462-8473, 2000.
- [8] Thomas CJ, Springer PA, Loeb GE, Berwald-Netter Y, Okun LM, "A miniature microelectrode array to monitor the bioelectric activity of cultured cells," *Exp Cell Res.*, vol.74, pp.61-66, 1972.
- [9] Oka H, Shimono K, Ogawa R, Sugihara H, Taketani M, "A new planar multielectrode array for extracellular recording: application to hippocampal acute slice," *J Neurosci Methods*, vol.93, pp.61-67, 1999.
- [10] Stett A, Egert U, Guenther E, Hofmann F, Meyer T, Nisch W, Haemmerle H, "Biological application of microelectrode arrays in drug discovery and basic research," *Anal Bioanal Chem.*, vol.377, pp.486-495, 2003.
- [11] Steidl E-M, Neveu E, Bertrand D, Buisson B, "The adult rat hippocampal slice revisited with multi-electrode arrays," *Brain Res.*, vol. 22, pp.70-84, 2006.
- [12] Haynes LE, Griffiths MR, Hyde RE, Barber DJ, Mitchell IJ, "Dexamethasone induces limited apoptosis and extensive sublethal damage to specific subregions of the striatum and hippocampus: implications for mood disorders," *J. Neurosci.*, vol. 104, pp.57-69, 2001.
- [13] Litke AM, Chichilnisky EJ, Dabrowski W, Grillo AA, Grybos P, Kashiguine S, Rahman M, Taylor G, "Large-scale imaging of regional output activity," *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research*, vol. A 501, pp.298-307, 2003.
- [14] Egert U, Schlosshauer B, Fennrich S, Nisch W, Fejtl M, Knott T, Müller T, Haemmerle H, "A Novel organotypic long-term culture of the rat hippocampus on substrate-integrated multielectrode arrays," *Brain Research Protocol*, vol. 2, pp.229-242, 1998.
- [15] Egert U, Knott T, Schwarz C, Nawrot M, Brandt A, Rotter S, Diesmann M, "MEA-Tools: an open source toolbox for the analysis of multi-electrode data with MATLAB," *J. Neurosci. Methods*, vol. 117, pp. 33-42, 2002.