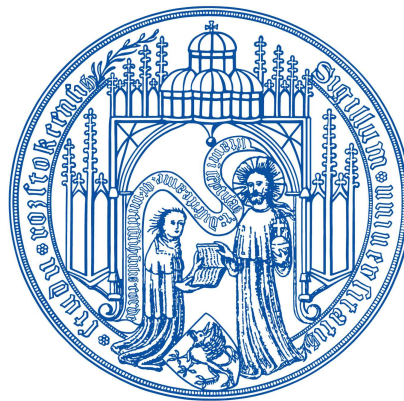


Integration eines Neuro-Sensors in ein Messsystem sowie Untersuchungen zur Unit-Separation

Dissertation
zur
Erlangung des akademischen Grades
Doktor-Ingenieur (Dr.-Ing.)
der Fakultät für Informatik und Elektrotechnik
der Universität Rostock



vorgelegt von:
René Schrott, geb. am 22.01.1974 in Zwenkau
aus Rostock

Rostock, 06. Juni 2009

Wissenschaftliche Betreuung:
Prof. Dr.-Ing. habil. Helmut Beikirch, Universität Rostock, IEF, IGS
Dr. rer. nat. Werner Baumann, Universität Rostock, MNF, Biophysik

URN: urn:nbn:de:gbv:28-diss2009-0082-1

1. Gutachter Prof. Dr.-Ing. habil. Helmut Beikirch
Universität Rostock, Fakultät für Informatik und Elektrotechnik
Institut für Gerätesysteme und Schaltungstechnik
A.-Einstein-Str. 2, D-18051 Rostock

2. Gutachter Prof. Dr.-Ing. habil. René Schüffny
Technische Universität Dresden,
Fakultät Elektrotechnik und Informationstechnik
Institut für Grundlagen der Elektrotechnik und Elektronik
01062 Dresden

3. Gutachter Prof. Dr.-Ing. Matthias Sturm
Hochschule für Technik, Wirtschaft und Kultur Leipzig (FH)
Fachbereich Elektrotechnik und Informationstechnik
Institut für Nachrichtentechnik
Postfach 30 00 66, 04251 Leipzig

Datum der Einreichung: 05.12.2008

Datum der Verteidigung: 20.04.2009

Die Veröffentlichung dieser Arbeit erfolgt als Open-Access zur Gewährleistung des freien und unbeschränkten Zugangs zu wissenschaftlichen Informationen im Internet.
(<http://www.open-access.net>).

URN: [urn:nbn:de:gbv:28-diss2009-0082-1](http://nbn:de:gbv:28-diss2009-0082-1) (<http://rosdok.uni-rostock.de/>)

If you torture the data long enough, Nature will confess.

Ronald Coase, Nobel laureat 1991.

Danksagung

Die hier vorgestellten Arbeiten rund um den Neurosensor konnten innerhalb des Landesforschungsschwerpunktes „Innovationsnetzwerk Biosystemtechnik“ begonnen und voran gebracht werden. Im Rahmen des Projektes „Neuronaler Silizium-Hybrid-Netzwerksensor zum Monitoring neuronaler Aktivitätszustände und Substanzwirkungen“ galt es dabei ein miniaturisiertes Silizium-Hybrid-Sensorsystem zu entwickeln. Dank verschiedener finanzieller Mittel der Europäischen Union (EFRE) und des Landes Mecklenburg-Vorpommern sowie der maßgeblichen Unterstützung des Halbleiterherstellers Micronas GmbH, Freiburg, konnte diese Entwicklung erfolgreich abgeschlossen werden. Deshalb gilt mein erster Dank diesen staatlichen Förderern und unserem wichtigsten Kooperationspartner Micronas. Hier möchte ich mich besonders bei Mirko Lehmann und Ingo Freund für die umfassende Zusammenarbeit bedanken.

Die wissenschaftliche Betreuung dieser Arbeit erfolgte fachübergreifend durch Prof. Dr.-Ing. habil. Helmut Beikirch und Dr. rer. nat. Werner Baumann, denen ich für zahlreiche wichtige Diskussionen und wesentliche Anregungen dankbar bin. Auf den soliden Grundlagen, die von Andreas Keuer, Carsten Tautorat und Gerold Bausch hinsichtlich der digitalen Signalverarbeitung, der *Hardware*-Entwicklung und Implementierung gelegt wurden, konnte ich mit meinen Arbeiten aufbauen und diese anschließend fortsetzen. Deshalb bin ich ihnen zu besonderem Dank verpflichtet. Dank der wichtigen Mitarbeit von Dr.-Ing. Klaus-Peter Kirchner konnte die *Hardware*-nahe Portierung verschiedener Verfahren der Signalverarbeitung erfolgreich realisiert werden. Dr. rer. nat. Erik Schreiber danke ich für die langfristige kritische Begleitung meiner Arbeiten.

Ich möchte auch Prof. Dr. Konrad Engel und Monty Tränkner für die Zusammenarbeit hinsichtlich der Signalklassifizierung danken. Philipp Julian Köster und Angela Podssun danke ich für die Zellkultur und Chippräparation während der zahlreichen Messreihen. Schließlich gilt mein Dank Danilo Schmück, Jan Taube, Jens Thieß, Detlef Krischker und Marcus Wego, welche meine Arbeiten im Anfangsstadium begleiteten und unterstützten. Zudem möchte ich mich bei Prof. Dr.-Ing. Matthias Sturm bedanken, der mich während meiner Diplomarbeit an der HTWK Leipzig betreut und anschließend zu einer Promotion an der Universität Rostock ermuntert hat. Natürlich gilt mein Dank in ganz besonderer Weise meiner Familie und meiner Freundin, die mich stets in meiner Arbeit bestärkt und unterstützt haben. Ohne diese wesentliche Förderung wäre die Promotion auf diese Art und Weise nicht möglich gewesen.

Kurzfassung

Innerhalb des Projektes „Neuronaler Silizium-Hybrid-Netzwerksensor zum Monitoring neuronaler Aktivitätszustände und Substanzwirkungen“ erfolgten am Institut für Gerätesysteme und Schaltungstechnik der Universität Rostock umfangreiche Untersuchungen zur Einbindung eines neuartigen neuronalen CMOS (*Complementary Metal Oxide Semiconductor*)-Sensors in ein entsprechendes Messsystem. Dieser Sensor umfasst neben einem MEA (Multielektrodenarray) auch mehrere FET (*Field Effect Transistor*)-basierte Sensoren zur Erfassung unterschiedlicher Parameter einer Zellkultur. Die Arbeiten wurden in enger Zusammenarbeit mit dem Lehrstuhl für Biophysik der Universität Rostock durchgeführt. Zusätzlich wurden diese Anstrengungen durch Industriepartner vor allem im Bezug auf die angewendete Chiptechnologie unterstützt.

Neben dem Test und der Inbetriebnahme des eigentlichen Neuro-Sensors wurden parallel dazu externe Schaltungskomponenten zur Versorgung, Konfiguration und Überwachung dieses Sensors sowie für den Messdatentransfer per USB (*Universal Serial Bus*) 2.0 entworfen und realisiert. Zusätzlich fand eine Algorithmenentwicklung statt, die die gewonnenen Sensorsignale aufbereitet und archiviert. Ziel war die Schaffung eines CMS[®] (*Cell Monitoring System*) unter Verwendung dieses Silizium-basierten Neuro-Chips. Aufgrund der relativ großen Anzahl von Sensoren auf dem Neuro-Chip wurde ein deutlich höheres Niveau der Automatisierung angestrebt, um die Nutzung des Sensorsystems zu vereinfachen.

Damit ergaben sich zwei Schwerpunkte dieser Arbeit: Die Inbetriebnahme des neuronalen Sensorchips, die Entwicklung und die Validierung der entwickelten externen Sensorumgebung sowie weiterhin der Entwurf, der Test und die Implementierung von Algorithmen der digitalen Signalverarbeitung. Einerseits wurde also die Sensorumgebung getestet und erweitert. Hier waren Signalkonditionierung und anschließende Datenakquisition von großer Bedeutung. Andererseits erfolgte die Entwicklung von Verfahren zur Detektion, Clusterung und Klassifizierung der gewonnenen Sensorsignale. Dabei wurden verschiedene Ansätze der Mustererkennung verfolgt und getestet.

Summary

The monitoring of excitable or electrogenic cells has been a research topic for several decades. Additionally to fundamental research scientific efforts in this context are focused on neurology, substance screenings, environmental monitoring or the development of prostheses. With the help of a semiconductor manufacturer a new hybrid CMOS (*Complementary Metal Oxide Semiconductor*) sensor chip has been developed at the University of Rostock. Beside a MEA (*Multi Electrode Array*) and varying types of FET (*Field Effect Transistor*) sensors this device also provides the means for on chip signal conditioning and multiplexing.

Within the scope of this work the neuronal sensor chip has been incorporated into a so called CMS[®] (*Cell Monitoring System*) to allow the in-vitro evaluation of cell network activities and substance effects. The system consists of the actual sensor chip, an external hardware platform for data acquisition and digital signal pre-processing and a computer. The platform transfers the measured data via USB (*Universal Serial Bus*) 2.0 onto the host for storage and later analysis. In close cooperation between the Institute of Electronic Appliances and Circuits and the Biophysics Institute of the University of Rostock appropriate hardware modules and software algorithms for the monitoring system have been designed and implemented.

The following documentation includes results of the operation procedures with regard to the silicon based neuronal sensor chip. Several hardware components of the developed external hardware platform ensure the data acquisition and the chip's power supply, configuration and control. In parallel algorithms for the analysis of the sensor signals have been developed and tested. These methods include measures for signal filtering and detection based on the coefficients of the discrete Wavelet transform and different approaches of pattern recognition. For the sensor signal classification mainly template matching based procedures were examined. All techniques aim at the establishment of automatic and adaptive data acquisition to increase the efficiency of the sensor usage.

Inhaltsverzeichnis

Tabellenverzeichnis	V
Abbildungsverzeichnis	VI
Abkürzungsverzeichnis	VIII
Symbolverzeichnis	XI
Griechische Symbole	XI
Fraktur	XI
Lateinische Symbole	XI
1 Einleitung	1
2 Problemstellung	3
2.1 MEA-Chips und deren Anwendungen	3
2.2 Signalverarbeitung und -analyse	5
3 Stand der Technik	7
3.1 Sensorsysteme	7
3.1.1 Erfassung metabolischer Parameter	7
3.1.2 Erfassung der elektrophysiologischen Netzwerkaktivität	9
3.1.3 Kommerzielle Lösungen	14
3.2 Signalauswertung und Mustererkennung	16
3.2.1 Verfahren zur Extraktion von Aktionspotentialen	17
3.2.2 Merkmale zur Klassifikation von Aktionspotentialen	20
3.2.3 Ansätze zur Clusterung	23
3.2.4 Verfahren zur offline Klassifikation	30
3.2.5 Verfahren zur online Klassifikation	31
3.2.6 Frei verfügbare Ansätze	32
3.2.7 Kommerzielle Lösungen	35
3.3 Vorläufige Bewertung und Probleme	35
3.3.1 MEA-Entwicklungen	35
3.3.2 Detektionsverfahren	38
3.3.3 Klassifikation	39
4 Aufgabenstellung	47

5	Elektronik-Konzept	48
5.1	Neuro-Sensor BISC 02	50
5.1.1	Prinzipieller Aufbau	50
5.1.2	Erste Sensortestumgebung	52
5.1.3	Messergebnisse	53
5.2	Externe Signalaufbereitung und Digitalisierung	65
5.3	<i>Software</i> -Konzept und Abläufe	69
5.3.1	FPGA Programmierung	69
5.3.2	Datenerfassung auf Messrechner	72
6	Digitale Signalverarbeitung	78
6.1	Signalaufbereitung und Detektion	79
6.1.1	Hintergrund	79
6.1.2	Simulation und Implementierung	81
6.2	Verfahren zur <i>Template</i> -Generation	83
6.2.1	Dichteuntersuchung im Musterraum	83
6.2.2	Analyse von Koeffizienten der diskreten <i>Wavelet</i> -Transformation	85
6.2.3	Analyse weiterer Merkmale möglicher Aktionspotentiale	87
6.3	Klassifikationsbeispiel	90
6.3.1	Datensynthese	90
6.3.2	Signalcharakterisierung und -aufbereitung	92
6.3.3	Zuordnung von Signalen mittels Kreuzkorrelation	102
6.3.4	Detektion und Klassifikation	104
6.3.5	Fazit	109
7	Biologische Messungen	111
7.1	Chipvorbereitung und Zellpräparation	111
7.2	Messaufbau, Datenerfassung und Archivierung	112
8	Zusammenfassung	115
8.1	Elektronik-Konzept	115
8.1.1	Sensorchip	115
8.1.2	Externe <i>Hardware</i>	116
8.1.3	<i>Software</i> -Konzept	118
8.2	Signalverarbeitung	118
8.2.1	Detektion	118
8.2.2	<i>Template</i> -Generation	119
8.2.3	Klassifikation	122
8.3	Anwendung des Chips	123
9	Ausblick	124
	Literaturverzeichnis	125
A	Neurosensor BISC 02	163

B Sensorumgebung	165
B.1 Gesamtsystem	165
B.2 FPGA und DSP Interface-Schaltung	167
Selbstständigkeitserklärung	168
Lebenslauf	169
Thesen der Dissertation	170
Glossar	172

Tabellenverzeichnis

3.1	Einige MEA-Entwicklungen der Gross-Gruppe	11
3.2	Einige MEA-Entwicklungen der Pine-Gruppe	11
3.3	Einige MEA-Entwicklungen der Wolf/Baumann-Gruppe	13
5.1	Elektrodenimpedanz unterschiedlicher Chips	55
5.2	Exemplarische Einschwingzeiten für den Sensorchip YAA1 04	60
5.3	Exemplarische Strom- und Leistungsaufnahme für den Sensorchip YAA1 04	60
5.4	Exemplarische Rauschspannungen im <i>Rbias</i> -Modus	62
5.5	Exemplarische Rauschspannungen im <i>Testbus</i> -Modus	62
5.6	Datenraten bei kontinuierlichem Transfer und einer Abtastrate von 20 kHz	70
5.7	Datenraten bei kontinuierlichem Transfer und einer Abtastrate von 33,3 kHz	70
6.1	Exemplarische Rauschabschätzung mittels DWT in mehreren Bändern	94
6.2	Exemplarische Rauschabschätzung mittels DWT in mehreren Bändern	95
6.3	Signalformabweichung nach dem Löschen einzelner Bänder der DWT	98
6.4	Signalformabweichung nach dem Löschen mehrerer Bänder der DWT	98
6.5	Signaldifferenzen bei einzelnen DWT- <i>Modes</i>	100
6.6	<i>Spike</i> -Detektion nach unterschiedlicher DWT-Filterung	106
6.7	Ergebnisse der korrelationsbasierten Klassifikation	108

Abbildungsverzeichnis

3.1	Klassifikationsarten nach [1]	24
5.1	Prinzip der Datenakquise bei MEA-Messungen nach [2]	48
5.2	Aufbau eines Systems unter Verwendung eines Hybridsensors nach [3]	49
5.3	Der Neurosensorchip BISC 02	50
5.4	Prinzipdarstellung des BISC 0201 bzw. 0202	51
5.5	Prinzipdarstellung der Schaltergruppe des BISC 0201 bzw. 0202	52
5.6	Ersatzschaltbild für die Messung der elektrischen Aktivität einer Zelle	54
5.7	Prinzip der Elektrodenimpedanzmessung	55
5.8	Impedanzen einzelner Elektroden ausgewählter Chips	55
5.9	Prinzip der Elektrodenbeschichtung mit Platin	56
5.10	Verlauf des Amplitudengangs des <i>on chip</i> Verstärkers	57
5.11	Verlauf des Amplitudengangs des <i>on chip</i> Tiefpasses	58
5.12	Verlauf des Amplitudengangs des <i>on chip Pad</i> -Treibers	59
5.13	Exemplarischer Amplitudengang des Elektrodensignals im <i>Rbias</i> -Modus	59
5.14	Sprungantwort und Einschwingzeit eines Tiefpasses nach [4]	60
5.15	Exemplarisches Amplitudenspektrum des Sensorrauschens	62
5.16	Exemplarische Verteilungsdichte der Werte einer <i>Rbias</i> -Rauschmessung	63
5.17	Exemplarische Verteilungsdichte der Werte einer <i>Testbus</i> -Rauschmessung	63
5.18	Prinzip der Signalverarbeitung für 64 MEA-Elektroden nach [5]	65
5.19	Prinzip der externen Signalverarbeitung der direkten Elektroden nach [5]	66
5.20	Messaufbau zur Erfassung des pH-Wertes nach [6]	67
5.21	Prinzip der ISFET-Messung nach [5]	68
5.22	Prinzip der Temperaturmessung nach [5]	68
5.23	Prinzip der Generation des Stimulussignals nach [5]	68
5.24	Prinzip des <i>Streaming</i> -Modus nach [7]	71
5.25	Prinzip des <i>Spike</i> -Modus nach [8]	73
5.26	Konfiguration und Datenarchivierung im <i>Streaming</i> -Modus	76
5.27	Konfiguration und Datenarchivierung im <i>Spike</i> -Modus	77
6.1	Exemplarische Amplitudenspektren von neuronalen Signalen und Rauschen	92
6.2	Rauschabschätzung in Abhängigkeit der DWT-Länge, $F_S = 20$ kHz	94
6.3	Rauschabschätzung in Abhängigkeit der DWT-Länge, $F_S = 33,3$ kHz	95
6.4	Skalierte db2 <i>Wavelets</i> und Skalierungsfunktion mit Amplitudengang	97
6.5	Amplitudengänge einer <i>Wavelet</i> -Filterbank sowie eines neuronalen Signals	97

6.6	Mögliche Artefakte aufgrund des Erweiterungsmodus der DWT	100
6.7	Exemplarische Verteilungsdichte und QQ-Plot des Sensorsgesamttrauschens . .	101
6.8	Exemplarische Amplitudenspektren sowie Formänderung aufgrund der DSV .	101
6.9	Rauschfreie, synthetisierte <i>Spikes</i> sowie mögliche <i>Wavelets</i>	105
7.1	Aufbau des verwendeten Sensorsystems	112
7.2	Messung an Herzmuskelzellen mit dem Chip YAB1 35	113
A.1	Abmessungen der passiven Elektroden des BISC 02 nach [9]	163
A.2	Anordnung der wichtigsten Funktionseinheiten des Neurosensorchips	164
A.3	Detailansicht der Sensorgruppe des BISC 02 nach [9]	164
B.1	Vereinfachte Darstellung des vollständigen <i>Hardware</i> -Konzeptes	166
B.2	Prinzipieller Aufbau des FPGA-DSP-Interface	167

Abkürzungsverzeichnis

AD	Analog-Digital	DFT	Diskrete Fourier-Transformation
Ag/AgCl	Silber/Silberchlorid	DGND	<i>Digital Ground</i>
AGND	<i>Analog Ground</i>	DLL	<i>Dynamic Link Library</i>
AKF	Autokorrelationsfunktion	DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
AKTR	Aktiver Widerstand	DSP	Digitaler Signalprozessor
AP	Aktionspotential	DSV	Digitale Signalverarbeitung
ASCII	<i>American Standard Code for Information Interchange</i>	DWT	Diskrete Wavelet-Transformation
ASIC	<i>Application Specific Integrated Circuit</i>	EEG	Elektroenzephalogramm
BISC	Biosensor Typ C	EFRE	Europäischer Fonds für regionale Entwicklung
BNC	<i>Bayonet Neill Concelman</i>	EKG	Elektrokardiographie
CLCC	<i>Ceramic Leadless Chip Carrier</i>	Ele	direkte Elektrode
CMOS	<i>Complementary Metal Oxide Semiconductor</i>	EM	<i>Expectation Maximization</i>
CMS®	<i>Cell Monitoring System</i>	EMG	Elektromyograph
CO ₂	Kohlendioxid	ETH	Eidgenössische Technische Hochschule
CPFET	<i>Cell Potential Field Effect Transistor</i>	FET	<i>Field Effect Transistor</i>
D1SGH	Dissoziationspufferlösung, Zusammensetzung siehe [10]	FFT	<i>Fast Fourier Transformation</i>
DA	Digital-Analog	FIFO	<i>First In First Out</i>
DDT	<i>Continuously Digitized Data</i>	FIR	<i>Finite Impulse Response</i>

FK	Falsch klassifiziert	LVDS	<i>Low-Voltage Differential Signalling</i>
FoM	<i>Figure of Merit</i>	MAD	<i>Median Absolute Deviation</i>
FPGA	<i>Field Programmable Gate Array</i>	MAP	<i>Multichannel Acquisition Processor</i>
GENESIS	<i>General Neural Simulation System</i>	MATLAB®	<i>MATrix LABoratory</i>
HHSim	<i>Hodgkin Huxley Simulator</i>	MD	Mean Absolute Deviation from the Mean
HMZ	Herzmuskelzellen	MEA	Multielektrodenarray
HTWK	Hochschule für Technik, Wirtschaft und Kultur	MEMS	<i>Microelectromechanical System</i>
I ² C	<i>Inter Integrated Circuit</i>	μTAS	<i>Micro Total Analysis System</i>
IDES	<i>Interdigitated Electrode Structure</i>	MOGS	Modulares Glaschip-System
IDWT	Inverse Diskrete <i>Wavelet</i> -Transformation	MUX	Multiplexer
IIR	<i>Infinite Impulse Response</i>	NaOAc	Natriumacetat
ISFET	<i>Ion Sensitive Field Effect Transistor</i>	NaOH	Natriumhydroxid
ISI	<i>Inter-Spike Interval</i>	NEO	<i>Nonlinear Energy Operator</i>
ISODATA	<i>Iterative Self-Organizing Data Analysis Technique</i>	NK	Nicht klassifiziert
ITO	<i>Indium Tin Oxide</i>	NMA	Neuromessadapter
KKF	Kreuzkorrelationsfunktion	NMI	Naturwissenschaftliches und Medizinisches Institut der Universität Tübingen
KNN	künstliches neuronales Netz	NMRI	<i>Naval Medical Research Institute, Outbreed White Mice Stem</i>
KS	Kolmogorov-Smirnov	OPV	Operationsverstärker
LabVIEW®	<i>Laboratory Virtual Instrumentation Engineering Workbench</i>	PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
LAPS	<i>Light Addressable Potentiometric Sensor</i>	PC	Personalcomputer

PCA.....	<i>Principal Component Analysis</i>	Si ₃ Ni ₄	Siliziumnitrid
PCI.....	<i>Peripheral Component Interconnect Bus</i>	SNR.....	<i>Signal to Noise Ratio</i>
pH.....	potentia hydrogenii	SPC.....	<i>Supraparamagnetic Clustering</i>
PID.....	Proportional-Integral-Differential-Verhalten	STFT.....	<i>Short Time Fourier Transformation</i>
PLX.....	Dateiformat der Firma <i>Plexon Inc.</i> , Dallas USA, zur Abspeicherung von detektierten Aktionspotentialen	Strg.....	Steuerung
PMMA.....	Polymethylmethacrylat	TD.....	Temperaturdiode
POM.....	Polyoxymethylen weiß	TEO.....	<i>Teager Energy Operator</i>
PSTH.....	<i>Post-Stimulus Time Histogramm</i>	USB.....	<i>Universal Serial Bus</i>
RC.....	Widerstand-Kondensator-Kombination	VHDL.....	<i>Very High Speed Integrated Circuit Hardware Description Language</i>
		VLSI.....	<i>Very Large-Scale Integration</i>
		WSC.....	<i>Wavelet Spike Classifier</i>

Symbolverzeichnis

Griechische Symbole

θ	Zufallsvariable, zu schätzender unbekannter Parametervektor	τ	Verschiebungsoperator
Θ	Parametersatz	ϕ	Skalierungsfunktion der <i>Wavelet</i> -Transformation
λ	Schwellenoperator	ψ	Mutter- <i>Wavelet</i>
ρ	Korrelationskoeffizient	ω	Klasse im Musterraum
σ	Standardabweichung, Sprungantwort	ω_g	Grenzfrequenz

Fraktur

\mathfrak{C}	Kovarianzmatrix	\mathfrak{W}	<i>Wavelet</i> -Transformation
----------------	-----------------	----------------	--------------------------------

Lateinische Symbole

a	Koeffizient z. B. der Fourier-Reihe bzw. der <i>Wavelet</i> -Transformation	d	Distanz, Anzahl der Dimensionen eines Mustervektors, Koeffizient der <i>Wavelet</i> -Transformation
b	Filterkoeffizient, Koeffizient der Fourier-Reihe	D	Cluster, Mustermenge, Datensatz, nicht lineare Schwellenoperation
B	Matrix, Optimierungskriterium	e	Fehler
c	Koeffizient, Variable	E	Erwartungswert
C	Fehlermaß, Optimierungskriterium	f	Funktion, Fourier-Reihe

f_g, f_{Grenz}	Grenzfrequenz	Q	Optimierungskriterium
f_{MUX}	Extern an den Sensorchip angelegte Multiplexerfrequenz	r	Zählvariable, Index, Exponent
f_{MUXch}	Für jeden Sensorkanal des MEA zur Verfügung stehende Abtastfrequenz	s	Streuung, Varianz
F_S	Abtastfrequenz	S	Schwerpunkt eines Clusters, Kreuzkorrelationsfunktion, Signal im Zeitbereich
G	Gleitender Mittelwert (<i>Moving Average</i>)	\hat{S}	Schätzung des wahren Signals
h	Zählvariable, Index	$Sp()$	Spur einer Matrix
i	Zählvariable, Index	t	Zeit, <i>Template</i>
I_{DS}	<i>Drain-Source</i> -Strom	t_e	Einschwingzeit
I_{TD}	Strom der Temperaturdiode	U_A	Ausgangsspannung
j	Zählvariable, Index	U_{BS}	<i>Bulk-Source</i> -Spannung
k	Anzahl der Muster bzw. Cluster, Index eines diskreten Abtastwertes, Zählvariable	U_{DS}	<i>Drain-Source</i> -Spannung
$\log_e()$	Logarithmus zur Basis e	U_E	Eingangsspannung
m	Mittelwert, Clusterzentrum, Skalierungsparameter bzw. Dilatation der diskreten <i>Wavelet</i> -Transformation, Zählvariable, Index	U_{GS}	<i>Gate-Source</i> -Spannung
\tilde{m}	projizierter Mittelwert	ν	Verhältnis
M	Anzahl Vektoren, Einheit Molar	V	Volumen im Musterraum
n	Ordnung, Anzahl Datenpunkte, Verschiebungsparameter bzw. Translation der diskreten <i>Wavelet</i> -Transformation, Zählvariable, Index	W	Matrix, Optimierungskriterium
N	Anzahl Datenpunkte, Rauschanteil	x	Argument, Punkt eines Datensatzes, Merkmalsvektor, diskretes abgetastetes Signal, Muster, Variable
p	Wahrscheinlichkeitsdichte	\bar{x}	Mittelwert
P	Wahrscheinlichkeit	\tilde{x}	Median
q	Anzahl Muster	X	Koeffizient der Kosinus- bzw. der <i>Wavelet</i> -Transformation, Zufallsvariable, Argument, reales Messsignal im Zeitbereich
		Y	Zufallsvariable, Funktionswert
		z	komplexe Variable der Z-Transformation
		Z	Ergebnis einer Schwellenoperation (<i>Thresholding</i>)

1 Einleitung

Die Zelle stellt die kleinste selbsterhaltende biologische Einheit dar. Aufgrund verschiedener Interaktionen zwischen einzelnen Zellen lassen sich bestimmte Phänomene messtechnisch erfassen. Zellsensoren können zur Messung der Adhäsion, zur Untersuchung des Metabolismus oder auch der Elektrophysiologie einer Zelle oder eines Zellverbandes genutzt werden. Vor allem biologische, neuronale Netze erweisen sich als sehr sensibel gegenüber Änderungen ihrer chemischen Umgebung. Die Reaktion dieser fehlertoleranten und spontan aktiven Netzwerke ist dabei oft substanz- und konzentrationsabhängig [11]. Seit mehr als 20 Jahren werden Neuronen und Herzmuskelzellen für nicht invasive, extrazelluläre Messungen erfolgreich auf Multielektrodenarrays kultiviert. Neben portablen Sensoransätzen existieren Versuche zur Parallelisierung der MEA-Messungen für Screening-Anwendungen in der Pharmaindustrie [12].

Biologische, neuronale Netze nutzen stereotype, also in der Regel gleich bleibende, elektrische Signale zur Informationsverarbeitung. Dabei werden komplexe Informationen in elektrische Signale umgesetzt, deren Bedeutung von der Verschaltung einzelner Neuronen abhängig ist. Die elektrischen Signale entsprechen Potentialänderungen, die aufgrund erregungsabhängiger Ionenströme durch die Zellmembran entstehen. So genannte lokale Potentiale mit kurzer Reichweite können ein Aktionspotential auslösen, welches als regenerativer Impuls große Entfernungen zurücklegen kann. Dieser Spannungsimpulse besitzen eine Amplitude von etwa 100 mV und eine Länge von ca. 1 ms Dauer. Vor allem die Anzahl dieser Aktionspotentiale pro Zeiteinheit und die Länge einer solchen Pulsfolge lassen einen Rückschluss auf die Reizung der tierischen Zellkultur zu. Die Form der Impulse bleibt dabei relativ konstant [13].

Mit *Patch Clamp*-Messungen können die Ströme einzelner Ionenkanäle der Zellmembran gemessen werden [14]. Die elektrische Aktivität kann in-vivo z. B. mit Mikroelektroden im zentralen Nervensystem erfasst werden [15]. Alternativ werden bei Untersuchungen in-vitro primäre Neuronen auf Multielektrodensystemen zur extrazellulären Signalerfassung kultiviert. Dabei entwickeln sich spontan aktive Netzwerke mit definierter, stabiler elektrischer Aktivität. Neuroaktive Substanzen bzw. externe elektrische Stimuli können die Netzwerkparameter charakteristisch beeinflussen. Diese Methodik kann in der neurobiologischen Grundlagenforschung für die klinische Diagnostik und für pharmakologische Tests angewendet werden [16]. Das gewonnene Aktivitätsmuster kann dabei zur Substanzbestimmung mit einer Reihe von Parametern beschrieben und anschließend mit einer Datenbank abgeglichen werden. Dieser „Fingerabdruck“ könnte auch zur Klassifikation unbekannter Wirkstoffe verwendet werden [17].

Ergänzend zu den traditionellen MEA (Multielektrodenarray), die meist auf einem Glassubstrat aufgebracht sind, existieren auch Halbleiter-basierte Elektrodenarrays. Diese Chips können mit standardisierten CMOS (*Complementary Metal Oxide Semiconductor*)-Prozessen hergestellt werden, wobei neben einer Verkleinerung der Sensorchipfläche auch eine Integration zusätzlicher Sensortypen wie z. B. CPFETs (*Cell Potential Field Effect Transistors*), ISFETs (*Ion Sensitive Field Effect Transistors*), Sauerstoffsensoren und Temperaturdioden erreicht werden kann. Darüber hinaus kann mit dieser Technologie eine Signalkonditionierung direkt auf dem Chip untergebracht werden, was zu einer Vereinfachung des Gesamtaufbaus des Messsystems beiträgt. Die parallele nicht invasive messtechnische Erfassung mehrerer Zellparameter verbessert das Verständnis von Prozessen auf der Zellebene [6, 18].

Eine vereinfachte Handhabung der Sensorsysteme und geeignete Verfahren der Signalverarbeitung ermöglichen einen Einsatz dieser Systeme z. B. zur Detektion von Gesundheitsrisiken [12]. Verschiedene Forschungsarbeiten an der Universität Rostock dienen der Kombination von metabolischen und elektrophysiologischen Messungen auf einem CMOS-Sensorchip. Im Rahmen dieser Arbeiten wurden bereits unterschiedliche *Cell Monitoring Systems* (CMS[®]) entwickelt und getestet [19]. Diverse Funktionalitäten sowohl im Bereich der Sensorik als auch bei der Datenverarbeitung und Visualisierung müssen für eine breitere Anwendung optimiert werden. Aus diesem Grund konzentrieren sich die weiteren Ausführungen auf eine planare MEA-Struktur, welche in einem neu entwickelten Silizium-basierten Neuro-Sensor integriert ist. Es werden verschiedene Ansätze zur Automatisierung der Datenakquise sowie Untersuchungen zur Datenverarbeitung beschrieben. Diese Maßnahmen sollen eine vereinfachte und effektivere Nutzung des Sensorchips in elektrophysiologischen Experimenten ermöglichen.

2 Problemstellung

2.1 MEA-Chips und deren Anwendungen

Die erste erfolgreiche MEA-Messung an kultivierten Herzmuskelzellen wurde von Thomas bereits 1972 veröffentlicht [20]. Wegweisende Arbeiten von Gross [21] und Pine [22] ermöglichten seit Ende der siebziger bzw. Anfang der achtziger Jahre die Etablierung der MEA-Technologie bezüglich neuronaler Zellkulturen. Neben der Messung an diesen Netzwerken stand zunehmend auch die elektrische Stimulation im Zentrum der Arbeiten. Es kamen dabei in der Regel Glassubstrat-basierte Chips mit aufgebracht, passiven Metallelektroden zum Einsatz. Diese Elektrodenarrays umfassten bis zu 64 Sensoren, an denen parallel gemessen werden konnte. Das neuronale Gewebe fötaler Mäuse wurde dabei direkt auf der Sensoroberfläche kultiviert. Die messbare Neuroaktivität wie auch das SNR (*Signal to Noise Ratio*) waren und sind dabei abhängig von Zelldichte sowie von der Zelladhäsion auf der Chipoberfläche [23].

Für langfristige Messungen ist ein geschlossenes System für die Lebenserhaltung der Zellkultur auf dem Chip notwendig. Eine externe Signalkonditionierung bereitet die Messsignale vor der Digitalisierung auf. Neben einer mikroskopischen Kontrolle der Zellkultur dient auch die Datenvisualisierung der Überwachung des Experimentes. Da mehrere Neuronen bzw. „Units“ in eine Elektrode einkoppeln können, werden diese unterschiedlichen Kurvenformen verschiedenen Klassen zur besseren Beschreibung der Netzwerkaktivität zugeordnet. Ein *Template Matching*-Algorithmus kann zur Klassifizierung der aufgezeichneten *Spike*-Aktivität benutzt werden [24]. Da nicht jede MEA-Elektrode eine eindeutige neuronale Aktivität aufweist, werden zur Optimierung der Klassifikation nur Sensorsignale oberhalb eines bestimmten Signalrauschverhältnisses für die Analyse ausgewählt.

Neben klassischen Glas-MEAs können auch halbleiterbasierte MEA-Chips zur Anwendung kommen. Auch hier werden die ermittelten Sensorsignale so abgetastet, dass eine Auswertung von Form und Auftreten der einzelnen Aktionspotentiale ermöglicht wird. Zwischen 30 bis 100 Neuronen des gesamten Netzwerkes können so pro MEA-Experiment erfasst, deren Signale aufgezeichnet und ausgewertet werden. So können feine Änderungen der elektrischen Aktivität und ihre Abhängigkeit von der Konzentration eines zugegebenen Wirkstoffes analysiert werden. Die entstehenden Dosis-Wirkungskurven ergeben einen „Fingerabdruck“, der die Substanzwirkung beschreiben kann. Mithilfe einer möglichst umfangreichen Referenzdatenbank und geeigneten Klassifizierungsverfahren kann dann die aktuelle Testsubstanz einer bestimmten Wirkungsgruppe zugeordnet werden [25].

Zur Realisierung multiparametrischer Messungen von Zellreaktionen wurden bereits in den Gruppen um Wolf und Baumann an den Universitäten Freiburg und Rostock zusätzliche Sensortypen mit Standardprozessen in Sensorchips integriert. In Kooperation mit dem Halbleiterhersteller Intermetall bzw. Micronas GmbH (Freiburg) konnten diese Chips u. a. mit ISFETs, CPFETs, IDEs und Temperatursensoren versehen und gefertigt werden [26, 27]. Es wurde ein modulares Sensorsystem entwickelt, welches verschiedene metabolische Messungen mit den Möglichkeiten der Lichtmikroskopie kombiniert [28]. Unter Nutzung dieser Erfahrungen entstehen seitdem an der Universität Rostock ebenfalls zusammen mit der Micronas GmbH verschiedene CMS[®] (*Cell Monitoring System*), die metabolische und elektrophysiologische Messungen auf einem Siliziumchip vereinen [6, 19].

Im Mittelpunkt dieser Arbeit steht der jüngste CMOS-Sensorchip, der an der Universität Rostock in Kooperation mit der Micronas GmbH entwickelt wurde. Dieser Chip BISC (Bio-sensor Typ C) 02 besitzt neben Sensoren für elektrophysiologische und metabolische Messungen auch eine integrierte Elektronik für eine Signalkonditionierung direkt auf dem Chip. Diese zusätzliche Integration einer Signalaufbereitung erlaubt einen vereinfachten Messaufbau, da die externe *Hardware* auf ein Minimum reduziert werden kann. Verschiedene Betriebsmodi erlauben neben der eigentlichen Messung u. a. auch die Möglichkeit der elektrischen Stimulation der Zellkultur [29]. Mit der zunehmenden Sensorvielfalt ist zwar eine umfangreichere Beschreibung der Netzwerkreaktion möglich. Jedoch stellt die erhöhte Sensorzahl auch größere Anforderungen an die zeitkritische Erfassung und Auswertung der anfallenden Daten.

Die Inbetriebnahme und die Verifizierung dieses Neurosensors sowie der Entwurf und die Evaluierung der erforderlichen externen Sensorumgebung bilden daher einen wesentlichen Schwerpunkt der Arbeiten. Das Verhalten des Sensors muss unter vielfältigen Messbedingungen und Betriebsmodi beschrieben und Parameter für eine optimale Sensoranwendung identifiziert werden. Zudem gilt es die mittels Multiplexer ausgegebenen Signale des Elektrodenarrays verlustfrei zu erfassen, zu verarbeiten und zu archivieren. Besonders bei einer kontinuierlichen Speicherung der anfallenden Messdaten müssen in Abhängigkeit der verwendeten Abtastrate z. T. erhebliche Datenmengen verwaltet werden. Zusätzlich zum *Mixed Signal Design* der externen *Hardware* müssen deshalb auch die erforderlichen Ressourcen für die parallele, zeitkritische Datenverarbeitung bereitgestellt werden. Das Ziel ist die Schaffung eines möglichst kompakten Messsystems, welches einfach zu handhaben sein muss. Die Messdatenerfassung muss dabei ohne Interaktionen durch den Anwender auskommen.

2.2 Signalverarbeitung und -analyse

Mit der zunehmenden Anzahl und Vielfalt der eingesetzten Sensoren erhöhen sich auch die Anforderungen an die Aufbereitung und die Analyse der anfallenden Datenmengen. Die Verarbeitung der metabolischen Sensorinformationen wie z. B. die des pH-Wertes, des Sauerstoffgehaltes, der Temperatur oder der Anhaftung der Zellkultur ist zunächst unkritisch, da sich diese Zellparameter lediglich innerhalb von Minuten bzw. Stunden ändern [6, 30]. Eine echtzeitfähige Analyse dieser Messwerte ist daher relativ einfach realisierbar. Elektrophysiologische Messungen stellen aufgrund ihrer deutlich höheren Dynamik und Parallelität bei MEA-Messungen größere Anforderungen an die Leistungsfähigkeit der verwendeten *Hard-* und *Software*.

Aufgrund der Notwendigkeit einzelne Aktionspotentiale mit wenigen Millisekunden Länge zu erfassen, muss die Abtastfrequenz im Vergleich zu metabolischen Messungen wesentlich erhöht werden. Allerdings beträgt die Datenmenge bereits bei der Nutzung einer moderaten Abtastfrequenz von 20 kHz pro Sensorelektrode und einer Auflösung von 16 Bit pro Abtastwert bei einem Array von 64 Elektroden 147 MByte pro Minute. Mehrstündige Messungen erfordern deshalb sehr schnell Methoden zur Reduzierung des Datenaufkommens bzw. Verfahren zur Datenkompression, um die archivierten Dateien nutzen zu können. Eine gängige Methode stellt in diesem Zusammenhang die Detektion und Extraktion der zu untersuchenden Aktionspotentiale dar. Auf diese Art und Weise kann die unnötige Speicherung von Sequenzen ohne erkennbare neuronale Aktivität vermieden werden. Es müssen allerdings Verfahren zur Verfügung stehen, die eine zuverlässige Detektion der *Spikes* ermöglichen.

In früheren Ansätzen wurden Verfahren der *Spike*-Detektion mit einer so genannten Signalintegration kombiniert, um eine weitere Reduktion der elektrophysiologischen Messdaten zu erreichen. Trotz der Tatsache, dass eine Sensorelektrode Signale mehrerer Zellen erfassen kann, wurden die gemessenen Aktionspotentiale zu einem Signal zusammengefasst und anschließend integriert. Die bei der Integration dieser Folge von Aktionspotentialen entstehende Fläche konnte zur Beschreibung der neuronalen Netzwerkaktivität genutzt werden. Diese starke Vereinfachung verhindert allerdings eine detaillierte Auswertung der Aktivitätsmerkmale [31]. Aus diesem Grund werden in aktuellen Ansätzen die jeweils registrierten Signalformen bestimmten Neuronen bzw. allgemeiner so genannten *Units* zugeordnet. Dieser auch als *Unit*-Separation bezeichnete Prozess erlaubt eine umfassendere Datenanalyse [32].

Ohne gezielte Vorbehandlung der Sensoroberfläche kann zu Beginn der Zellkultur keine Vorhersage bezüglich der zu erwartenden Zellverteilung auf dem Chip getroffen werden. Die Lage der elektrisch aktiven Zellen relativ zu den Sensoren und somit die Zell-Sensor-Kopplung beeinflussen jedoch die Anzahl der messbaren Aktionspotentiale unterschiedlicher Zellen. Zusätzlich werden die Form und die Amplitude dieser Signale auch von den Elektroden Eigenschaften, also der Elektrodenimpedanz, selbst beeinflusst [33]. Die Zelldichte der Kultur sowie die konkreten Anwuchsbedingungen können die Messsignale zu-

sätzlich beeinflussen [23]. Die bisherige Vorgehensweise bei der Detektion und *Unit*-Separation umfasst deshalb meist die zeitaufwändige manuelle Untersuchung jedes einzelnen Messkanals des MEA-Experimentes.

Diese Prozedur erfordert einen erfahrenen Experimentator, der in jeder Situation eine optimale Auswertung und Nutzung der Messsignale ermöglichen muss. Trotz etablierter, unterstützender Werkzeuge wie z. B. eine zeitnahe Datenvisualisierung, die Nutzung von Zeit-Spannungsfenster, so genannten *Trigger Boxes* und z. B. die Anwendung der PCA-Analyse ist die Detektion und Klassifizierung der neuronalen Signale von einer hohen Subjektivität geprägt. Es existiert keine Standardisierung der allgemeinen Vorgehensweise bei der manuellen *Unit*-Separation. Besonders bei unterschiedlichen Signalrauschabständen kann es aufgrund der geringen visuellen Unterscheidung der einzelnen *Spike*-Klassen bei verschiedenen Nutzern, die denselben Datensatz auswerten, zu unterschiedlichen Ergebnissen kommen. Diese Tatsache beeinflusst auch die Interpretation der gewonnenen und klassifizierten neuronalen Daten [34].

Zur Vereinfachung bisheriger und Ermöglichung neuer Anwendungen ist zunächst die Automatisierung der Datenakquise bei MEA-Experimenten erforderlich. Der hier bislang notwendige Einsatz von geschultem Personal, die zeitaufwändige Vorbereitung und die Durchführung der Messungen sind entscheidende Hindernisse für den verbreiteten Einsatz der MEA-Technologie. Zur Kompression der erfassten Daten müssen effektive Methoden zur Detektion neuronaler Aktivität genutzt werden. Eine Signalkonditionierung, die eine Rauschreduzierung und die Entfernung von Gleichanteilen beinhaltet, kann diese Detektion wirkungsvoll unterstützen. Idealerweise müsste eine automatisierte Klassifikation der gewonnenen Aktionspotentiale die Messanordnung ergänzen. Trotz jahrzehntelanger Forschung auf diesem Gebiet konnten diesbezüglich allerdings noch keine allgemein gültigen Verfahren gefunden werden.

Die genutzten Zelltypen, die Vorgehensweise bei der Zellkultur sowie die Art der verwendeten Sensorarten können große Auswirkungen auf Ergebnisse eines MEA-Experimentes haben. Variierende Signalrauschabstände, in Aussehen und Amplitude schwankende Aktionspotentiale, das mögliche zeitgleiche Auftreten mehrerer *Spikes* an einer MEA-Elektrode, eine Signalformänderung in Phasen hoher neuronaler Aktivität sowie sich ändernde Klassenmerkmale während des Experimentes stellen eine große Herausforderung für jedes Klassifikationsverfahren dar. Im Rahmen dieser Arbeit können deshalb nur mögliche Ansätze der Mustererkennung und deren Vor- und Nachteile skizziert werden. Generell ist in diesem Zusammenhang eine *online* Klassifikation wünschenswert, da eine zeitnahe Beurteilung des Netzwerkzustandes die Gestaltung des weiteren Experimentverlaufes erlauben kann. Somit könnten eine deutliche Reduzierung der Messdatenmenge und eine potentielle Nutzung in parallelisierten Messanordnungen möglich sein.

3 Stand der Technik

Zell-basierte Biosensoren nutzen die natürlich entwickelte Sensitivität lebender Zellen gegenüber biologischen oder biologisch aktiven Substanzen. Die verwendeten Sensoren ermöglichen u. a. die Untersuchung des Zellstoffwechsels und die Erfassung elektrischer Potentiale. Bei einer extrazellulären, also nichtinvasiven Untersuchung an Zellen und Zellnetzwerken sind die Signalfortpflanzung und die Zellkopplung über einen längeren Zeitraum beobachtbar. Neben dissoziierten Zellen werden auch Hirnschnitte bei Experimenten in-vitro genutzt. Parameter wie z. B. die Amplitude von Aktionspotentialen und die *Burst-Rate* können zur Klassifizierung neuroaktiver Substanzen genutzt werden. Einschränkungen dieser Sensortechnologie bestehen jedoch hinsichtlich der Datenanalyse, der Reproduzierbarkeit und dem Vertrauen auf primären, von Tieren gewonnenen Zellen [35].

3.1 Sensorsysteme

Zunächst sollen die für diese Arbeit relevanten Sensorentwicklungen verschiedener Forschergruppen in Bezug auf die Erfassung metabolischer und elektrophysiologischer Sensorsignale von kultivierten neuronalen Zellnetzwerken in-vitro übersichtsartig vorgestellt werden. Es erfolgt dabei eine Konzentration auf planare Sensorchipsysteme zur extrazellulären Messung dieser Parameter in-vitro, die die Zellaktivität charakterisieren können. Anschließend werden Ansätze zur Aufbereitung und Verarbeitung der aufgenommenen Sensordaten erläutert. Methoden der Signaldetektion, der Merkmalsextraktion, der Clusterung und der Klassifizierung von einzelnen Aktionspotentialen werden skizziert. Zudem sollen grundsätzliche Unterschiede in der *online* bzw. der *offline* Datenanalyse herausgearbeitet werden. Eine Darstellung frei verfügbarer und kommerzieller Lösungen sowie eine vorläufige Bewertung einzelner Prozeduren schließt diese Ausführungen ab.

3.1.1 Erfassung metabolischer Parameter

Chip-basierte Sensorsysteme können derzeit im Wesentlichen vier Zellparameter erfassen. Neben den Änderungsraten der Ansäuerungsleistung und des zellulären Sauerstoffaustausches, können auch Änderungen der Zellform und damit verbunden der Zell-Zell-Kontakt sowie die elektrophysiologische Zellaktivität gemessen werden. Für die Untersuchung der einzelnen Parameter können sowohl die pH-empfindlichen ISFET (*Ion Sensitive Field Effect Transistor*) als auch das LAPS (*Light Addressable Potentiometric Sensor*)-System, planare

Sauerstoffsensoren, Impedanzsensoren wie z. B. IDES (*Interdigitated Electrode Structure*) und im letzten Fall Mikroelektrodenarrays bzw. *PatchClamp*-Chips zur Anwendung kommen. Neben einigen multiparametrischen Ansätzen erfolgt auf einem Chip meist nur die Untersuchung eines der genannten Parameter. Die extrazelluläre Ansäuerung sowie der zelluläre Sauerstoffaustausch stellen die wichtigsten Größen zur Beschreibung des Zellmetabolismus dar. Weitere Verfahren basieren auf der Detektion der Stoffwechselwärme sowie dem Nachweis von Glukose und Laktat in der Zellkultur in-vitro [36].

Bei der Nutzung von ISFETs zum Nachweis der Ansäuerung kommen Feldeffekttransistoren mit einer Ionen-sensitiven *Gate*-Beschichtung zur Anwendung. Diese Beschichtung bindet selektiv Protonen, was zu einer pH-abhängigen *Gate-Source*-Spannung U_{GS} an diesem Transistor führt. Bei der Verwendung von Siliziumnitrid als *Gate*-Isolator kann eine pH-Sensitivität von $40 \text{ mV}/\text{pH}$ bis zu $58 \text{ mV}/\text{pH}$ bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ erzielt werden. Die Messung der Ansäuerung erfolgt in einem *Stop and Go*-Pumpmodus, wobei die Testsubstanz während der Pumpphase zugegeben wird. Die eigentliche Messung der pH-Wertänderung findet unter Nutzung eines akkumulierenden Effektes ohne Pumpe statt. Mit der nächsten Pumpphase wird das Zellmedium erneuert. Alternativ zu pH-sensitiven ISFETs können auch LAPS-Systeme mit vergleichbarer Sensitivität und Drift eingesetzt werden [6, 36].

Prinzipiell können ISFET mit alternativen, Ionen-selektiven *Gate*-Isolatoren auch zum Nachweis anderer Ionen verwendet werden [11]. Neben der Ansäuerungsrate ist auch der Sauerstoffverbrauch in einer Zellkultur von Interesse. Der Sauerstoffaustausch kann z. B. mit Clark-Elektroden bzw. mit einer Kombination aus ISFET und Elektrode in einem zur pH-Messung vergleichbaren *Stop and Go* Modus gemessen werden. Zusätzlich zu Untersuchungen des Zellmetabolismus können auch Parameter wie das Zellwachstum oder die Änderung der Zellmorphologie bzw. die Zelladhäsion von Interesse sein. Die Impedanz einer Zellkultur, die mithilfe verschiedener Elektrodenanordnungen, Elektrodenstrukturen und Wechsellspannungen kleiner Amplitude gemessen werden kann, liefert ein weiteres Maß für wirkende Umwelteinflüsse [11, 36].

An den Universitäten Freiburg und Rostock konnte die Gruppe um Prof. Wolf wichtige Untersuchungen zu metabolischen Sensoren durchführen. Diese Arbeiten werden von den Gruppen um Wolf bzw. Baumann an der Technischen Universität München bzw. an der Universität Rostock fortgeführt. Neben Sensoren zur Ermittlung der Zelladhäsion [30] wurde u. a. ein modulares System entwickelt, welches diskrete pH- und Sauerstoffsensoren sowie die IDES-Struktur mit der Mikroskopie kombiniert [37]. Dieses *PhysioControl-Microsystem* wurde an der Universität Rostock zu einem Silizium-basierten, multiparametrischen *Cell Monitoring System* erweitert [6]. Vielfältige, separat entwickelte Sensortypen lassen sich in das CMS[®] einfügen [38]. Zusätzlich werden z. B. integrierte Sauerstoff- und Temperatursensoren auf Hybrid-Chips [39], Impedanzsensoren auf Keramiksubstrat [40] bzw. kombinierte metabolische und elektrophysiologischen Messungen [41] untersucht.

Die Gruppe um Martinoia beschäftigt sich ebenfalls mit Sensorchips, die Parameter des Zellmetabolismus erfassen können. Es wurden Chips entworfen, die mittels ISFET-Arrays

örtliche Variationen des pH-Wertes einer Zellkultur detektieren können. Diese *Arrays* wurden entweder mit Temperatur- und Leitfähigkeitssensoren bzw. mit konventionellen Metallelektroden kombiniert. Im letztgenannten Fall sollten ISFET-Sensoren sowohl die Ansäuerungsleistung als auch die elektrische Zellaktivität erfassen können [42]. Für metabolische Messungen wurde eine Sensorchip, welcher ein integriertes ISFET-*Array*, Temperatursensoren und Leitfähigkeitssensor besaß, mit einem weiteren Chip zur Signalaufbereitung kombiniert [43]. In zahlreichen Modellentwürfen und Simulationen wird zudem das Verhalten von ISFET eingehend untersucht [44–46].

3.1.2 Erfassung der elektrophysiologischen Netzwerkaktivität

Verschiedene Daten zeigen, dass die Eigenschaften und das Verhalten einzelner Zellen durch die Struktur und Aktivität des umgebenden Netzwerkes dynamisch beeinflusst werden. Das Verständnis des Zusammenspiels einzelner Zellen in kleinen und doch komplexen Netzwerken in-vitro könnte die Vorhersagbarkeit von Substanzwirkungen auf den intakten Organismus verbessern. Die elektrophysiologischen Messmethoden in-vitro umfassen die Beobachtung von z. B. *Spike*-Aktivitäten und niederfrequenten Potentialen in neuronalen Netzwerken. Zusätzlich können MEA auch zur Stimulation des neuronalen Netzwerkes verwendet werden. Gegenwärtig existieren zwei verschiedene, technische Methoden zur Realisierung von MEA. Diese können mit passiven, planaren Metallelektroden oder alternativ mit integrierten FET (*Field Effect Transistor*) aufgebaut werden. Das MEA-System gilt als etabliertes, zuverlässiges Werkzeug, welches auch kommerziell für verschiedene Anwendungen erhältlich ist [47].

Planare Mikroelektrodenarrays bestehen allgemein aus einem Glas-, Plastik- oder Siliziumsubstrat auf dem ein leitfähiges Material wie z. B. Gold, Platin oder ITO (*Indium Tin Oxide*) in Form von Elektroden und Leiterbahnen aufgebracht wurde. Eine darüber befindliche Schicht aus z. B. Fotolack, Polyimid bzw. Siliziumdioxid isoliert die elektrisch leitfähigen Materialien des MEA mit Ausnahme der Elektroden vom Kulturmedium. In Abhängigkeit der Elektroden- und Zellgröße können dann einzelne Zellen oder Zellpopulationen untersucht werden [48]. Im Gegensatz zur traditionellen Verwendung von Mikropipetten zur Untersuchung einzelner Zellen eignen sich die meist matrixartig angeordneten Array-Elektroden oder FET zur gleichzeitigen Ermittlung der elektrischen Aktivität mehrerer Zellen. Bei diesen nichtinvasiven Langzeituntersuchungen können die Elektroden auch zur Stimulation des Netzwerkes genutzt werden. Die MEA-Technologie wird seit den 1970er Jahren angewendet und stetig weiterentwickelt [49].

Bis vor wenigen Jahren hat jedes interessierte Forschungslabor diese MEA selbst entwickelt, produziert und angewendet. Kommerziell erhältliche MEA mehrerer Hersteller mit angepasstem, elektronischem Equipment vereinfachen die Anwendung dieser Technologie deutlich. Diese MEA besitzen meist ein Glassubstrat mit aufgetragenen Goldelektroden. Diese Elektroden können entsprechend der zu untersuchenden Zellen einen Durchmesser

von 10 μm bis 100 μm aufweisen. Zur Erhöhung des messbaren Sensorsignals wird die Elektrodenimpedanz oft mit einer *Black Platin*-Beschichtung reduziert. Die Haltbarkeit dieser porösen Schicht kann mittels Ultraschallbehandlung erhöht werden. Generell muss bei den verwendeten Materialien strikt auf Biokompatibilität geachtet werden [49].

MEA eignen sich nicht nur zur Kultivierung verschiedener Arten von neuronaler Zellen. Sie können auch zur Analyse von Herzmuskelzellen und der Retina angewendet werden. Bei der Nutzung von nicht mit Oberflächenstrukturen versehenen bzw. nicht oberflächenbehandelten MEA kann eine Elektrode mehrere Neuronen gleichzeitig erfassen bzw. unter ungünstigen Umständen keinerlei Aktivität messen. Dies macht im ersten Fall die Entwicklung von Klassifikationsalgorithmen erforderlich. Verschiedene Beschichtungsverfahren sowie ein verbessertes Verständnis der Kopplung von Zelle und Elektrode können die Ausbeute eines MEA-Experimentes verbessern. Derzeit existiert aber im Bezug auf die Signalwandlung noch keine definitive Theorie, die die Interpretation oder Vorhersage der mit MEA beobachteten Signale ermöglichen würde [50].

Verschiedene Parameter wie z. B. der Abstand von Elektrode und Zelle oder die Unterschiede in der Art und Dichte der Ionenkanäle der Zellmembran lassen sich während eines Experimentes nur eingeschränkt quantifizieren oder kontrollieren. Daher besitzt nicht nur die Signalform sondern auch der Zeitpunkt eines Ereignisses, der so genannte Zeitstempel, eine Bedeutung. Neben dem Entwurf traditioneller MEA für bestimmte Anwendungen existieren eine Reihe von Arbeiten, die mit verschiedenen z. B. mechanischen oder geometrischen Maßnahmen die Kopplung von Elektrode und Zelle und damit den Signalausabstand zu verbessern suchen [50].

Die meisten der bisher verwendeten MEA weisen etwa 60 Sensorelektroden auf, welche für eine vollständige Untersuchung von Netzwerken mit vielen Tausend Neuronen nicht ausreichend sind. Jedoch stellt die Entwicklung leistungsfähiger, in Echtzeit einsetzbarer *Software* zur Detektion und Klassifizierung von Aktionspotentialen noch ein wesentliches Hindernis bei der Vergrößerung der Sensorzahl dar. Gleiches gilt für die echtzeitfähige Erkennung und Analyse von zeitlichen und räumlichen, neuronalen Aktivitätsmustern. Die praktische Integration dieser deutlich größeren Sensorzahl sowie die Handhabung der resultierenden, sehr großen Datensätze stellen weitere Herausforderungen dar [49].

Die Forschergruppe um Guenter Gross gilt neben der um Jerome Pine als eine der wichtigsten Wegbereiter der MEA-Technologie. Für die extrazelluläre Erfassung elektrophysiologischer Signale verschiedener Neuronenarten werden MEA unterschiedlicher Geometrien auf Glassubstrat entwickelt und eingesetzt. Die passiven Metallelektroden bestehen meist aus ITO, welches ggf. mit Gold beschichtet wird. Diese Spezialisierung auf Glaschips ermöglicht den Einsatz der Durchlichtmikroskopie. Neben der rein messtechnischen Aktivitätserfassung werden auch Stimulationsexperimente durchgeführt. Die selbstentwickelten MEA-Chips werden auch kommerziell angeboten, siehe auch Abschnitt 3.1.3. Eine kleine Auswahl dieser Chips ist in Tabelle 3.1 aufgelistet.

Substrat	MEA-Elektroden				Stimulation	Quelle
	Material	Anzahl	$\varnothing/\mu\text{m}$	Abstand/ μm		
Glas	Au	36	12	90 ... 200	ja	[21, 51]
Glas	Au auf ITO	50	10	25 ... 200	–	[52]
Glas	Au auf ITO	64	8 ... 10	40 ... 200	ja	[23, 53]

Tabelle 3.1: Einige MEA-Entwicklungen der Gross-Gruppe

Unabhängig von Gross konnte auch Pine frühzeitig zeigen, dass MEA zur extrazellulären Messung an bzw. zur Stimulation von neuronalen Zellkulturen geeignet sind [22]. Speziell entwickelte Multielektrodenarrays wurden auch zu Untersuchungen der Retina verwendet [54]. Neben der Entwicklung klassischer MEA werden auch Techniken zur Verbesserung des Signalrauschverhältnisses extrazellulärer Ableitungen untersucht. So wurde das Aufsetzen einzelner Elektroden auf ausgesuchte Neuronen getestet [55] bzw. ein „Käfig“ um das zu untersuchende Neuron konstruiert [56, 57]. In enger Kooperation mit Potter führen Wissenschaftler der Pine-Gruppe auch weiterhin Untersuchungen an neuronalen Zellkulturen mit traditionellen Glas-MEA durch [58, 59].

Substrat	Material	MEA-Elektroden				Stimulation	Quelle
		Anzahl	Maße/ μm		Abstand/ μm		
			\varnothing	L x B			
Glas	Pt auf Au	32	–	8 x 10	250	ja	[22]
Glas	Pt auf ITO	32 ... 64	10	–	30 ... 70	optisch	[54]
Si	Pt auf Au	16	–	8 x 8	100	ja	[60]

Tabelle 3.2: Einige MEA-Entwicklungen der Pine-Gruppe

Wissenschaftler des Naturwissenschaftlichen und Medizinischen Institutes der Universität Tübingen (NMI) und der Universität Freiburg zählen zu den führenden Entwicklern und Anwendern von Glas-basierten MEA und entsprechender externer Messtechnik zur Untersuchung elektrisch aktiver Zellen. Neben Herzmuskelzellen werden auch Retinae und Hirnschnitte im Bezug auf lokale Feldpotentiale und *Spike*-Aktivität mit selbst entworfenen MEA untersucht [47, 61, 62]. Zur Verbesserung der Nährstoffzufuhr, der Zellanhaftung und des Signalrauschabstandes wird auch mit perforierten MEA-Substraten und dem Einsatz von Mikrofluidik experimentiert [63]. Ein weiteres Forschungsgebiet umfasst die Automatisierung von *Patch Clamp*-Untersuchungen [64]. Über eine Firmenausgründung werden diese Glas-MEA in vielfältigen Ausführungen mit der dazugehörigen Messtechnik vertrieben, siehe auch Abschnitt 3.1.3.

Neben den bereits im Abschnitt 3.1.1 vorgestellten Arbeiten zur Analyse metabolischer Parameter wertet die Gruppe um Martinoia auch die elektrophysiologische Aktivität von Zellkulturen aus. Sie experimentiert ebenfalls mit MEA-Entwürfen zur Optimierung des SNR und der Nährstoffversorgung bei Messungen an Hirnschnitten [65, 66]. Bei Arbeiten an dis-

soziierten Neuronen werden sowohl Glas-Chips des NMI genutzt [67] als auch eigene Glas-MEA mit strukturierter Oberfläche getestet. Mit diesen Strukturen kann die Verteilung des neuronalen Netzes und die Interaktionen zwischen den einzelnen Teilnetzwerken kontrolliert werden [68]. In Kooperation mit anderen Wissenschaftlern wird auch an einem Array hoher Elektrodendichte geforscht. Die CMOS-Technologie ermöglicht hier die Integration einer Signalkonditionierung und einer Ausleselogik direkt auf dem Chip. Allerdings können die verwendeten Verstärker ein relativ großes Rauschen aufweisen [69].

Die Gruppe um Kovacs entwickelte zunächst auch ein Silizium-MEA, welches Stimulations- und Messmöglichkeiten für Experimente an Hirnschnitten bot [70]. In Kooperation mit der Gruppe um Stenger wurde zudem ein Sensorsystem geschaffen, das aus einem Halbleiter-basierten MEA und einem separaten CMOS-Chip für die Signalkonditionierung und Stimulation bestand. Das System konnte erfolgreich bei Messungen an Herzmuskelzellen eingesetzt werden [71]. Auch im Hinblick auf mögliche militärische Anwendungen wurde die Entwicklung eines portablen MEA-Systems vorangetrieben. In diesem Zusammenhang kommen entweder selbst entwickelte Halbleiter-MEA [72, 73], CMOS-Zellkartuschen mit integriertem MEA und Signalkonditionierung [74] oder Glas-MEA der Gross-Gruppe zum Einsatz [75].

Basierend auf Arbeiten von Meister erfolgt in der Gruppe um Litke und Dabrowski eine Sensorentwicklung speziell für Experimente an Retina-Gewebe. Das Gesamtsystem besteht aus einem passiven Glas-MEA und einem VLSI (*Very Large-Scale Integration*)-Chip zur Signalkonditionierung und Datenerfassung [76, 77]. Zusätzlich kann die Datenauswertung mit einer Kamera unterstützt werden [78]. Bemerkenswert ist die schrittweise Erhöhung der Elektrodendichte bzw. die Verkleinerung der Elektrodengröße auf unterschiedlichen MEA. Neben Chips, die zwischen 61 und 519 Sensoren besitzen, existiert auch eine Machbarkeitsstudie bezüglich eines MEA mit bis zu 2000 passiven Elektroden auf Glas-Substrat [79, 80]. Externe, mehrkanalige ASIC (*Application Specific Integrated Circuit*)-Schaltkreise dienen der parallelen Aufbereitung der ausgekoppelten MEA-Signale [81, 82].

Die Entwicklung CMOS basierter MEA ist auch ein Forschungsschwerpunkt der Gruppe um Baltes und Hierlemann. Ein modulartig aufgebautes MEA aus zunächst 16 Elektroden, integrierter Signalkonditionierung, AD (Analog-Digital)- und DA (Digital-Analog)-Wandler, Multiplexer und Temperatursensor kann bei Bedarf skaliert werden, um eine größere Sensoranzahl zu realisieren [83, 84]. Dieses anspruchsvolle Design kann sowohl zur Ableitung der Zellaktivität als auch zur Stimulation elektrisch aktiver Zellen eingesetzt werden. An einem 128 Sensorelektroden umfassenden Chip konnten umfangreiche Funktionstests bezüglich der Signalkonditionierung, des Rauschverhaltens und der Elektrodenimpedanz sowie elektrophysiologische Messungen an Herzmuskelzellen erfolgen [85].

Zusätzlich zu den Arbeiten mit metabolischen Sensorchips, siehe auch Abschnitt 3.1.1, widmen sich die Gruppen um Wolf und Baumann auch der Anwendung und Entwicklung von MEA-Chips. Neben der Nutzung von MEAs aus dem Gross-Labor und Arbeiten an Mini-Glaschips (MOGS) [86] werden für verschiedene CMS[®] auch eigene Sensorchips auf Siliziumbasis eingesetzt. Ein Schwerpunkt bildet dabei die multiparametrische Erfassung des

Zellverhaltens [87]. Neben Sensoren für elektrophysiologische Analysen sind deshalb auch metabolische Sensoren mittels CMOS auf den Chips integriert, siehe auch Tabelle 3.3. Aufgrund des auch bei anderen Forschergruppen auftretenden CPFET (*Cell Potential Field Effect Transistor*)-Rauschproblems [36] wird die elektrische Zellaktivität meist mit passiven Elektroden aufgezeichnet. Zur Vereinfachung des Messaufbaus besitzt der aktuelle neuronale Sensorchip zudem eine Signalkonditionierung und Multiplexer *on chip*.

Elektroden	CPFET	TDi	ISFET	O ₂ FET	NH ₄ ⁺ FET	<i>on chip</i> Elektronik	Quelle
9	24	1	–	–	–	nein	[16, 36]
58	8	1	2	2	2	nein	[16, 88]
68	14	–	2	–	–	ja	[89]

Tabelle 3.3: Einige MEA-Entwicklungen der Wolf/Baumann-Gruppe

Es existieren viele weitere, vergleichbare Entwicklungen von Multielektrodenarrays, wie z. B. [90–92]. Interessante Ansätze integrieren u. a. Mikrofluidik in diese Chips [93, 94] oder realisieren die Adressierung individueller Sensorelektroden mittels Laser [95]. Zahlreiche Entwürfe streben eine Verbesserung des Signalrauschabstandes einer Messung an. Zu diesem Zweck kann ein kleines MEA gezielt über der Zellkultur positioniert [96], die MEA-Oberfläche strukturiert [97], Mikrofluidik angewendet [98] oder spezielle Elektrodenformen konstruiert werden [99]. Eine Oberflächenbehandlung des MEA kann zudem die Zell-Sensor-Kopplung verbessern [100]. Die Gruppe um Curtis beschäftigt sich nicht nur mit MEA-Entwicklungen [101, 102] sondern untersucht auch den Einfluss verschiedener Substratoberflächen auf die Reaktion der darauf kultivierten Zellen [103–105].

Die von einigen Forschergruppen eingesetzten Feldeffekttransistoren stellen eine Alternative zu Elektroden-basierten MEA-Ansätzen dar. Fromherz und seine Mitarbeiter betrieben zunächst Grundlagenforschung an einzelnen Neuronen und Transistoren. Ersatzschaltbilder und Kontaktmodelle zur Beschreibung des Übergangs Zelle-Transistor dienten der Verifikation der beobachteten Signalverläufe [106–108]. Bei Messungen an neuronalen Zellen mittels FET-Array zeigte sich jedoch, dass der Effektivwert des Transistorrauschens in der Größenordnung der zu erwartenden Amplitude der Aktionspotentiale liegen kann [109]. Zur Optimierung weiterer Transistorarrays wurde die Kopplung zwischen Chip und Zellen einzeln bzw. paarweise an Neuronen eingehend analysiert und beschrieben. Bei Untersuchungen an kleinen Netzwerken wurden dabei relativ große Neuronen von Wirbellosen z. T. mittels Strukturen auf der Chipoberfläche immobilisiert, um optimale Bedingungen für die Signalaufzeichnung zu schaffen [110, 111].

Ein bemerkenswertes Resultat dieser Arbeiten ist ein Sensorchip mit einem Array aus 16384 FET, welche in 128 Reihen angeordnet sind. Über eine integrierte Ausleselogik, Verstärkern, Multiplexern und Treibern werden die Sensorsignale ausgegeben. Die Neuronen werden allerdings nicht mehr direkt auf dem *Gate* des Transistors kultiviert. Es kommt vielmehr eine Kombination aus Elektrode und darunter liegendem Feldeffekttransistor zum Einsatz [112]. Trotz des überarbeiteten FET-Designs weist auch dieser Chip im Vergleich zu möglichen

Spike-Amplituden von Säugetierneuronen ein relativ hohes Rauschniveau von etwa 280 μV effektiv auf [113]. Ein weiterer Ansatz mit Arrays aus Kapazitäten und FETs dient der Untersuchung der elektrischen Aktivität von Hirnschnitten. Nach der Stimulation bestimmter Areale können lokale Feldpotentiale gemessen und so die Aktivität einzelner Hirnregionen beurteilt werden [114].

Die Gruppe um Offenhäusser setzt ebenfalls FET zur Erfassung der elektrophysiologischen Zellaktivität ein. Mit einem FET-Array und parallelen *Patch Clamp*-Messungen konnte gezeigt werden, dass elektrische Signale von Säugetierneuronen prinzipiell gemessen werden können. Das Eigenrauschen der eingesetzten Transistoren kann aber auch hier ein Problem darstellen [115, 116]. Zur Verringerung des Rauschens wurde der FET-Ansatz deshalb ebenfalls zu einer Anordnung aus Sensorelektrode und FET abgeändert [117, 118]. Auch dieses Verfahren weist somit gewisse Ähnlichkeiten zu klassischen MEA-Ansätzen auf, in denen passive Elektroden mit externen Verstärkern verbunden werden. Aufgrund des dennoch vorhandenen FET-Rauschniveaus kann dieses Verfahren etablierte Methoden zumindest ergänzen [119]. Weiterhin wird die Zell-Transistor-Kopplung [120, 121] oder die Optimierung des FET-Designs untersucht [122]. Das im letzten Fall angewendete *Floating Gate*-Verfahren kann allerdings relativ anfällig für Störsignale sein, wie sie z. B. durch Aufladungen und Substanzzugaben während eines Experimentes entstehen können.

3.1.3 Kommerzielle Lösungen

3.1.3.1 Metabolische Sensoren

Verschiedenen Arbeiten der Gruppen um Wolf und Baumann haben zu Firmenausgründungen geführt, die die erzielten Forschungsergebnisse vermarkten [123, 124]. Ein aus diskreten Sensorelementen und Sensorchips bestehendes Messsystem wurde eine Zeit lang von der Physikalisch-Technischen Studien GmbH angeboten [6, 35]. Das aus dem Lehrstuhl für Biophysik der Universität Rostock heraus gegründete Unternehmen Bionas[®] konzentriert sich auf den Vertrieb eines kompletten Analysesystems zur nichtinvasiven Erfassung verschiedener metabolischer Zellparameter. Es können so die Adhäsion, der Sauerstoffgehalt und die Ansäuerungsleistung einer Zellpopulation ermittelt werden [125–127].

Die Firma *Molecular Devices* ermöglichte mit dem *Cytosensor Microphysiometer* die Ermittlung der stoffwechselabhängigen Ansäuerungsleistung einer Zellkultur. Die pH-Messung findet in diesem Fall in einer Durchflusskammer statt, deren Boden von einem *Light Addressable Potentiometric Sensor*-Element gebildet wird. Dabei beeinflusst die Wasserstoffionenkonzentration in der Messkammer das Oberflächenpotential des Sensorelementes, welches so einen Rückschluss auf den pH-Wert ermöglicht [128, 129].

3.1.3.2 Elektrophysiologische Sensoren

Einer der führenden kommerziellen Anbieter von Glas-basierten Multielektrodenarrays ist die *Multi Channel Systems MCS GmbH*. Neben planaren standardisierten MEA mit Titaniumnitrid-Elektroden werden auch MEA für Untersuchungen an Retinae und Hirnschnitten mit einer unterschiedlichen Elektrodendichte vom Naturwissenschaftlichen und Medizinischen Institut der Universität Tübingen hergestellt, wobei die Substrate entsprechend den Anforderungen flexibel, besonders dünn oder perforiert ausgeführt werden können. In Ergänzung dazu kann von diesem Anbieter umfangreiche *Hardware* und *Software* zur Messung von Aktionspotentialen und lokalen Feldpotentialen bezogen werden [130–132].

Die Firma *Ayanda Biosystems* bietet ebenso zahlreiche Glas-basierte MEA an, die an die Messtechnik von *Multi Channel Systems* angeschlossen werden können. Diese MEA weisen unterschiedliche Elektrodenmaterialien und Geometrien auf [133]. Die Firma *Panasonic* vertreibt gleichfalls MEA, welche das Kernstück des so genannten MED64-Systems bilden. Diese ebenfalls Glas-basierten Multielektrodenarrays können entsprechend der Anwendung unterschiedliche Geometrien aufweisen und besitzen meist mit Platin beschichtete ITO-Elektroden. Ergänzende externe Module u. a. zur Signalaufbereitung und Digitalisierung werden ebenfalls angeboten [134, 135]. Über das Gross-Labor [136] können gleichfalls Glas-basierte MEA unterschiedlicher Geometrien bezogen werden. Hier beschränkt sich das weitere Angebot auf Zubehör für die Zellkultur. Zur Datenakquise werden Geräte der Firma *Plexon Inc.* empfohlen.

Weitere Anbieter wie z. B. *ELume Inc.* und *ALA Scientific Instruments* ermöglichen zudem die Fertigung von Multielektrodenarrays in kleinen Stückzahlen nach Kundenwünschen [137, 138]. Neben den bereits genannten MEA-Herstellern gibt es eine relativ große Auswahl weiterer Anbieter, die ergänzende *Hardware* zur externen Signalaufbereitung sowie *Software* zur Systemkonfiguration und zur weiteren Analyse der Messsignale anbieten. Eine Auswahl dieser Firmen wird in den Abschnitten 3.1.3.3 bzw. 3.2.7 vorgestellt.

3.1.3.3 Datenerfassung

Es existiert eine Reihe von Herstellern, die neben konkreten Sensoren auch ergänzende *Hardware*-Komponenten zum Aufbau kompletter elektrophysiologischer Messarbeitsplätze anbieten. *Multi Channel Systems* entwickelt und vertreibt neben Multielektrodenarrays auch Module für die externe Konditionierung und Digitalisierung der Messsignale, die Zellstimulation, ggf. die Mikrofluidik, die Temperaturkontrolle und die Spannungsversorgung [132]. *Plexon Inc.* ist ein weiterer Anbieter von Systemen zur extrazellulären Messung und Analyse neuronaler Aktivität. Hier kann z. B. der so genannte MAP (*Multichannel Acquisition Processor*) zur messtechnischen Erfassung von Aktionspotentialen und lokalen Feldpotentialen zum Einsatz kommen [139]. Zusätzliches Equipment zur Erfassung des Verhaltens von Versuchstieren ist ebenso erhältlich [140].

Auch das so genannte *MED64*-System der Firma *Panasonic* umfasst neben den eigentlichen MEA zusätzliche Gerätetechnik für die Vorverstärkung und Digitalisierung der Messdaten sowie für die Stimulation von elektrisch aktiven Netzwerken [141]. Zu weiteren Anbietern von *Hardware*-Komponenten gehören in diesem Zusammenhang u. a. *Alpha Omega Engineering Ltd.* [142], *Cambridge Electronic Design Ltd.* [143], *Neuralynx* [144], *Tucker-Davis Technologies* [145] und *Molecular Devices*. Eine Übersicht mit weiteren Firmen ist unter [146] zu finden. *Software*-Werkzeuge zur Aufbereitung und Analyse der gewonnenen Messdaten werden im Abschnitt 3.2.7 vorgestellt.

3.2 Signalauswertung und Mustererkennung

Systeme zur Mustererkennung umfassen vier wichtige Bestandteile: Die Erfassung und Sammlung von Daten, die Gewinnung und Repräsentation von Merkmalen, die Ermittlung von Ähnlichkeiten und der Entwurf eines Musterklassifikators sowie die Bewertung des Verfahrens. Zudem können diese Methoden in einem gewissen Ausmaß anhand von Beispielen lernen und sich anpassen. Das Problem der Mustererkennung kann allgemein als eine Suche nach einer Näherungsfunktion aufgefasst werden, welche die Wahrscheinlichkeit der Fehlklassifikation verringert. Das Ziel ist die Entwicklung eines mathematischen Zusammenhangs zwischen den vorhandenen Eingangsdaten und ihrer möglichen Klassenzugehörigkeit. Die Auswahl einer geeigneten Merkmalsmenge ist eine der schwierigsten Aufgaben beim Design eines Klassifikators. Die große Menge an Merkmale verhindert eine systematische Untersuchung aller Interaktionsmöglichkeiten [147].

Aus diesem Grund wird meist anhand eines als geeignet angesehenen Verfahrens eine Teilmenge der möglichen Merkmale für die Klassifikation ausgesucht. Da allgemein 2^N Teilmengen für N Merkmale existieren, werden diese Merkmale oftmals mit einem zweckmäßigen Kriterium nach ihrem Rang sortiert und nur die wichtigsten für die weitere Analyse genutzt. Diese Verfahrensweise kann jedoch zu einer suboptimalen Klassifikation führen. Nach Abschluss der Merkmalsgewinnung kann der Klassifikator entworfen werden. Neben der Wahl eines Modells umfasst dies auch die Auswahl eines Entfernungs- bzw. Ähnlichkeitsmaßes. Untersuchungen zur Bewertung von Klassifikatoren sind relativ selten, da sie eine bestimmte Kooperation unter den verschiedenen Forschergruppen besonders in Bezug auf geeignete Datenbanken und Bewertungsverfahren erfordern [147].

Im Zusammenhang mit elektrisch aktiven Zellkulturen stehen bei der Signalauswertung die Erfassung und die Klassifikation so genannter Aktionspotentiale im Vordergrund. Diese oftmals auch als *Spikes* bezeichneten Kurven stellen einen wichtigen Bestandteil der neuronalen Zellaktivität dar und weisen für ein bestimmtes Neuron relativ ähnliche Verläufe auf. Bei MEA-Experimenten können mit einer Sensorelektrode eine oder mehrere Zellen gleichzeitig erfasst werden, siehe z. B. [148], wobei diese Anzahl von der Größe der Elektrodenfläche und vom Neuronentyp abhängig ist. Deshalb wird in der englischsprachigen Literatur eine solche Messung häufig als *Multi-Unit Recording* bezeichnet.

Zur Reduzierung der erfassten MEA-Sensordaten wurde in früheren Verfahren, trotz der Möglichkeit mehrerer *Units* in der Nähe einer Elektrode, das aufgezeichnete Signal integriert, wobei die resultierende Fläche die erfasste neuronale Aktivität repräsentierte. Diese deutliche Vereinfachung gestattet aber keine eingehende Analyse der Aktivitätsmerkmale [31]. Vor allem bei einem deutlich unterschiedlichen Verhalten der einzelnen Neuronen eines Netzwerkes kann eine Zuordnung der neuronalen Aktivität zu bestimmten Zellen die Aussagekraft bzw. den Informationsgehalt einer Messung erhöhen [149]. Speziell in der Grundlagenforschung kann diese Aktivitätszuordnung Einblicke z. B. in die Kommunikation, die Datenverarbeitung und die Informationsspeicherung eines biologischen Netzwerkes ermöglichen.

Die vorhandenen Variationen der Amplitude und der Form eines Aktionspotentials werden durch den Typ und die Größe der untersuchten Zellen, durch die Lage der Sensorelektrode bezüglich der Zelle und z. B. durch die Zellaktivität selbst beeinflusst. Somit kann mittels einer geeigneten Merkmalsextraktion eine Zuordnung bzw. eine Klassifikation der einzelnen Aktionspotentiale durchgeführt werden. *Spikes* einer Klasse werden dabei einer bestimmten Zelle bzw. anonym einer *Unit* des Netzwerkes zugeordnet. Dieser auch als *Unit-Separation* bezeichnete Vorgang erlaubt Einblicke in den zeitlichen und räumlichen Verlauf der Aktivität eines biologischen neuronalen Netzes.

Nach der Detektion der Aktionspotentiale können zu Beginn der Messung wichtige Parameter für die spätere Klassifikation identifiziert werden. Dazu gehören u. a. die Extraktion geeigneter Signalmerkmale der *Spikes* und die Feststellung der Anzahl der vorhandenen Klassen pro Sensorelektrode. Zu diesem Zweck können verschiedene *Cluster*-Methoden auf die ermittelten Merkmalsvektoren angewendet werden. Anschließend kann die Klassifizierung des restlichen Datensatzes bzw. der nachfolgend erfassten *Spikes* unter Nutzung der gefundenen *Templates* und bestimmter Distanzmaße durchgeführt werden. Dabei wird die Kurvenform wenn möglich einer existierenden Klasse zugeordnet und das verwendete *Template* aktualisiert, um kleineren Veränderungen während des Experimentes Rechnung zu tragen. Falls erforderlich kann eine neue Klasse eingerichtet werden, um eine Klassifizierung zu ermöglichen [150].

3.2.1 Verfahren zur Extraktion von Aktionspotentialen

Bereits sehr frühzeitig wurden Aktionspotentiale mittels Amplitudenschwellen detektiert. Bei einer Überschreitung des vorgegebenen Schwellwertes durch die aufgezeichnete Spannungsamplitude erfolgt die Extraktion eines definierten Signalabschnittes, der in der Regel einen Bereich vor und nach dem Triggerpunkt umfasst [151]. Die Schwellendetektion ist am weitesten verbreitet und relativ einfach in *Hardware* oder *Software* implementierbar. Meist erfolgt eine visuelle Kontrolle des gewählten Schwellwertes. Besonders bei geringem Signalrauschabstand kann die neuronale Aktivität mittels Schwellendetektion nicht perfekt vom Hintergrundrauschen separiert werden. Es muss deshalb ein Kompromiss bezüglich der Schwellenhöhe gefunden werden [152].

Der Schwellwert sollte so niedrig sein, dass kein *Spike* verpasst wird, auch *False Negative* genannt, bzw. so hoch sein, dass keine Hintergrundaktivität detektiert wird, auch *False Positive* genannt. Zusätzliche Fehler können durch sich überlagernde Aktionspotentiale entstehen, da dann die Größe der gemessenen *Spike*-Amplitude deutlich variieren kann [152]. Darüber hinaus kann z. B. die Spannungsdifferenz zwischen Maximum und Minimum eines potentiellen *Spike* innerhalb eines Zeitfensters zur Detektion genutzt [153] oder das Rauschniveau eines Datensegmentes ohne neuronale Aktivität zur Bestimmung einer positiven bzw. negativen Detektionsschwelle verwendet werden [154].

Die Detektion und auch die Klassifizierung von Aktionspotentialen mittels *Template Matching* ist besonders in Fällen geeignet, in denen aufgrund des Hintergrundrauschens nicht zuverlässig mit herkömmlichen Detektionsschwellen gearbeitet werden kann. Ausgehend von einer Bibliothek an Modellaktionspotentialen oder *Templates* wird die Ähnlichkeit dieser *Templates* mit dem Signal der Sensorelektrode berechnet. Wenn diese Ähnlichkeit zu einem Zeitpunkt groß genug ist, kann das AP (Aktionspotential) detektiert und extrahiert werden. Die *Templates* können auf vielfältige Weise z. B. mittels der Hauptkomponenten der PCA (*Principal Component Analysis*) [155] oder mittels der Abtastwerte der Modell-*Spikes* [156] gebildet werden.

Ein vergleichbarer, weit verbreiteter Detektions- und Klassifikationsansatz basiert auf so genannten *Trigger Boxes*. Mittels einfacher Schwellendetektion werden potentielle Aktionspotentiale gefunden. Diese Kurvenverläufe werden aber erst dann als *Spikes* identifiziert und extrahiert, wenn sie geeignet platzierte Zeit-Spannungsfenster passieren. Trotz einfacher Implementierung des Verfahrens müssen diese Fenster für jede Sensorelektrode aufwändig manuell gesetzt werden. Bei einem geringen Signalrauschabstand treten ähnliche Probleme wie bei der einfachen Schwellendetektion auf [157]. Das ISI (*Inter-Spike Interval*) kann dann zur Überprüfung der Qualität der *Unit*-Separation genutzt werden, da die meisten Zellen eine Refraktärzeit von mindestens 1 ms besitzen [152].

Mithilfe der *Wavelet*-Transformation können Ausgangsdaten in mehrere Stufen unterschiedlicher Auflösung zerlegt werden. Das genutzte und unterschiedlich skalierte Mutter-*Wavelet* wird dabei mit dem Datensatz korreliert. Aufgrund der ggf. vorhandenen Ähnlichkeit von *Wavelet* und Aktionspotential kann diese Transformation u. a. auch zur Detektion von *Spikes* genutzt werden. Eine Signalaufbereitung bzw. Filterung ist ebenso möglich [158]. Vielfältige Lösungsansätze sowohl zur *Spike*-Detektion als auch zur Klassifizierung mittels *Wavelet*-Transformation werden in der Literatur beschrieben [159–164]. Diese Methode kann auch bei kleinem SNR angewendet werden [165, 166]. Bei Verwendung von geeigneten DWT (Diskrete *Wavelet*-Transformation)-Varianten und Modellen ist eine Detektion auch ohne vorherige Kenntnis der Kurvenformen möglich [167, 168].

Alternativ kann die *Spike*-Detektion auch durch die Auswertung der Signalenergie erfolgen [169, 170]. Mit dem so genannten TEO (*Teager Energy Operator*) kann sehr effektiv eine Abschätzung der Signalenergie im Zeitbereich erfolgen, indem bei einer kurzzeitigen Erhöhung von Amplitude und Frequenz des Messsignals auf eine Änderung der Signalenergie geschlossen wird [171]. Die Detektion erfolgt anschließend durch den Vergleich

mit einer bestimmten Schwelle [172, 173]. Eine Detektion von Aktionspotentialen ist auch mittels KNN (künstliches neuronales Netz) nach entsprechendem Training möglich, wobei aber die Rauschcharakteristik und das Aussehen der zu detektierenden Kurvenformen bekannt sein müssen [154]. Weitere Verfahren zur Detektion analysieren die mathematischen Ableitung des Signals [174–176] bzw. berechnen den Mittelwert und die Variabilität der Signalamplitude des Messsignals [177].

Traditionelle Verfahren zur Bestimmung einer Detektionsschwelle mittels Effektivwertberechnung innerhalb eines Zeitfensters favorisieren Aktionspotentiale mit großer Amplitude. Zudem ist die Rauschcharakteristik z. B. in Abhängigkeit des Experimentverlaufes nicht notwendigerweise konstant. Eine adaptive Detektionsschwelle kann in diesem Zusammenhang bei einer zunehmenden Anzahl von Sensorelektroden gegenüber einer manuellen Einstellung vorteilhaft sein. Unter der Annahme von bandbegrenztem und Gauß-verteiletem Rauschen kann der Effektivwert bzw. die Standardabweichung des Hintergrundrauschens durch die Auswertung der Frequenz der Überschreitung der Detektionsschwelle bestimmt werden. Mittels Rückkopplung kann die eigentliche Detektionsschwelle aufgrund dieser Rauschabschätzung dann variiert werden [178, 179].

Die Ausrichtung von detektierten *Spikes* bezüglich ihrer größten Auslenkung ist besonders bei stärkerem Rauschen problematisch und fehlerbehaftet. Die Ergebnisse der nachfolgenden Signalverarbeitung, wie z. B. der PCA, können deshalb beeinträchtigt werden. Eine Überabtastung bzw. eine Interpolation zwischen den Abtastwerten kann die Genauigkeit der Ausrichtung der Aktionspotentiale verbessern [180–182]. Bei einer Untersuchung der extrahierten Aktionspotentiale im Frequenzbereich können Ausrichtungsfehler und damit eine geringere *Cluster*-Kompaktheit bei der nachfolgenden PCA vermieden werden. Bei Nutzung der Amplitudeninformation der DFT (Diskrete Fourier-Transformation) bzw. bei Anwendung der verschiebungsinvarianten DWT und einer Unterdrückung der Phaseninformation kann eine Verbesserung der anschließenden Projektion bzw. Clusterung erzielt werden [183].

Neben programmtechnischen Lösungen existieren auch *Hardware*-Ansätze zur Detektion, Ausrichtung und Klassifizierung von Aktionspotentialen, die z. T. bereits bekannte Verfahren unter dem Gesichtspunkt eines besonders geringen Energieverbrauchs der Schaltung implementieren. Beispielsweise können Aktionspotentiale mittels Detektionsschwelle und Überabtastung extrahiert und nachfolgend unter Verwendung unterschiedlicher Verfahren ausgerichtet werden. Die dabei gewonnenen Informationen lassen sich auch bei einer späteren Klassifizierung nutzen [181, 184]. Zudem lassen sich *Template Matching* Methoden zur Klassifizierung von *Spikes* in CMOS realisieren [185].

3.2.2 Merkmale zur Klassifikation von Aktionspotentialen

Bei in-vivo Untersuchungen am kortikalen Gewebe können pro Sensorelektrode durchschnittlich zwei bis drei Neuronen bzw. *Units* identifiziert werden [186]. Auch unter in-vitro Bedingungen können Elektroden eines MEA ein oder mehrere *Units* aufzeichnen, wobei allerdings etwa nur die Hälfte der Elektroden eine neuronale Aktivität registrieren [32]. Die Zuordnung einzelner *Spikes* zu bestimmten Neuronen gestattet es, einen wesentlichen Teil der Information eines solchen *Multi-Unit*-Signals zu erhalten. Dies trifft vor allem dann zu, wenn die beteiligten Neuronen ein klar unterscheidbares Verhalten aufweisen. Dagegen unterscheidet sich der Informationsgehalt einer Messung mit sich ähnlich verhaltenden Neuronen vor bzw. nach einer Klassifizierung weniger stark [149].

Template Matching wurde bereits sehr früh zur Klassifikation von *Spikes* eingesetzt. Es wurde manuell ein bestimmtes Aktionspotential oder die Mittelung mehrerer ähnlicher Aktionspotentiale als Standard bzw. *Template* ausgewählt und mit den verbliebenen Kurvenformen einer Messung verglichen. Als Ähnlichkeitsmaß wurde die quadrierte Differenz oder die Summe der absoluten Differenzen zwischen den Abtastwerten des *Template* und des aktuell untersuchten Aktionspotentials ermittelt oder das Ergebnis einer Kreuzkorrelation genutzt. Zudem gab es Ansätze, die aus einem Datensatz automatisch eine bestimmte Anzahl von *Templates* extrahierten, wobei diese *Templates* vorgegebene Anforderungen z. B. hinsichtlich ihrer Amplitude und Länge erfüllen mussten [151].

Auch so genannte *Matched Filter* bzw. Optimalfilter, die im weitesten Sinne den *Template Matching*-Verfahren zugeordnet werden können, wurden bereits zur Klassifikation neuronaler Daten genutzt. Unter der Annahme, dass das Rauschspektrum und die Form der Aktionspotentiale genau geschätzt werden können, wird für jedes *Spike*-Modell ein Filter entworfen, das nur auf dieses Modell maximal reagiert. Die neuronalen Messdaten werden dann mit einem Satz dieser Filter gefaltet und entsprechend der größten Filterantwort klassifiziert [152]. Dieser Ansatz kann gut bei Mehrkanalmessungen eingesetzt werden, in denen einzelne *Units* auf wenigstens zwei unterschiedlichen Kanälen aufgezeichnet werden. Es kann auch zur Trennung von sich überlagernden Aktionspotentialen genutzt werden [154] [151]. Die zusätzliche Einbeziehung der Aktivitätsstatistiken der untersuchten *Units* kann zu einer Verbesserung der Klassifizierung führen [151, 187].

Es wurde zudem frühzeitig erkannt, dass nicht alle Abtastwerte eines Aktionspotentials für eine zuverlässige Klassifizierung benötigt werden und somit auch eine Reduzierung des Rechenaufwandes erzielt werden kann. Es wurden daher verschiedene Ansätze verfolgt, die eine Merkmalsminimierung anstrebten. Dazu zählten u. a. Histogrammuntersuchungen, die Anwendung von Schwellen oder die Nutzung einer Kostenfunktion zur Identifizierung von Abtastpunkten, die sich bei verschiedenen *Spikes* möglichst deutlich voneinander unterscheiden. Die PCA wurde und wird als ein weiteres, diesmal automatisiertes Verfahren der Merkmalsreduzierung genutzt. Meist wird ein *Spike* dann durch die skalierbare Summe der ersten zwei bis drei Hauptkomponenten dargestellt [151].

Ähnlich wie bei der Detektion wurde auch bei der Klassifizierung früh die *Spike*-Amplitude als ein mögliches Kriterium genutzt. Neben der Auswertung des Maximums des Aktionspotentials wurden auch die Spannungsdifferenz zwischen Maximum und Minimum, die *Spike*-Polarität, das zeitliche Auftreten und der Abstand der Extrema, die Länge der *Spikes* und mögliche Nulldurchgänge analysiert. Auch hier wurden z. T. Histogramme genutzt, um eine bestmögliche Klasseneinteilung vornehmen zu können. Weitere Klassifizierungsansätze nutzten z. B. die Koeffizienten einer Fourier-Reihe bzw. die einer Kurvenanpassung, die Fläche unter einem Aktionspotential, den Effektivwert eines *Spike*, die Geschwindigkeit eines Aktionspotentials entlang der Nervenfasern oder ein Toleranzband um den eigentlichen Kurvenverlauf [151]. Es existieren des weiteren Verfahren zur Klassifizierung von *Spikes* im Frequenzbereich [48], die auch geeignet sind, mögliche zeitliche Verschiebungen einzelner Aktionspotentiale zueinander zu tolerieren [188].

Alternativ können statistische Verfahren nach Bayes zur Klassifizierung angewendet werden. Die Information zu möglichen Kurvenformen und Aktivitätsraten, auch *Firing Rate* genannt, der einzelnen *Units* kann dabei zur Minimierung der Wahrscheinlichkeit von Klassifikationsfehlern genutzt werden. Nach Abschätzung der *Firing Rates* der einzelnen *Units* wird die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten von Aktionspotentialen einzelner Neuronen sowie die Wahrscheinlichkeit der zeitlichen Überlappung dieser *Spikes* bestimmt. Basierend auf diesen Einschätzungen kann das Neuron ausgewählt werden, welches die aktuell untersuchte Kurvenform am wahrscheinlichsten generiert hat. Zudem können Ausreißer aufgrund ihrer Unwahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden [152, 153]. Allerdings kann es aufgrund der Variation der *Firing Rate* problematisch sein, bestimmte Aussagen zu den Wahrscheinlichkeiten einzelner *Spikes* zu machen [189].

In bestimmten Situationen können zwei verschiedene Neuronen mit ähnlicher Morphologie und vergleichbarem Abstand zur Sensorelektrode Aktionspotentiale mit ähnlichem Verlauf generieren. In diesen Fällen kann der Einsatz von Mehrfachelektroden, also z. B. Stereotroden und Tetraden etc., sinnvoll sein, da die Neuronen dann mit größerer Wahrscheinlichkeit einen ungleichen Abstand zu den einzelnen Elektroden besitzen. Die mit diesen Einzelelektroden gemessenen Aktionspotentiale einer *Unit* weisen folglich jeweils eine unterschiedliche Amplitude auf. Diese Tatsache kann auch zur Positionsbestimmung des untersuchten Neurons innerhalb des Netzwerkes genutzt werden. Aufgrund der zusätzlichen Informationen kann die Klassifizierung verbessert und zeitliche Überlappungen von *Spikes* aufgelöst werden. Viele Klassifikationsansätze für Einzelelektroden können auch auf Mehrfachelektroden übertragen werden [152]. Bei Verwendung von Mehrfachelektroden kann zudem das Signalrauschverhältnis des Messsignals durch Reduzierung des korrelierten Hintergrundrauschens verbessert werden [190, 191].

Die *Independent Component Analysis* stellt einen neueren statistischen Ansatz zur Klassifikation von Aktionspotentialen dar. Das ursprünglich für die *Blind Source Separation* entwickelte Verfahren benötigt keine Informationen über die Formen der zu untersuchenden Aktionspotentiale. Allgemein sollen N unabhängige Signale gewonnen werden, die mit unbekanntem Wichtungsfaktor auf N Kanälen bzw. Elektroden linear überlagert wurden. Die zu-

grunde liegenden Signalquellen werden als statistisch unabhängig angenommen. Das Ziel ist die Bestimmung der Wichtungen mit denen die beste Separation der einzelnen Signale erzielt werden kann. Eine weitere Annahme für das Verfahren besteht darin, dass die Anzahl der Kanäle bzw. der Elektroden mit der Anzahl der Signalquellen übereinstimmen muss. Diese Bedingung ist für Einfelektroden nicht gewährleistet. Zudem kann nicht immer von einer linearen Überlagerung der Signale ausgegangen werden [152]. Dieses Verfahren kann jedoch bei in-vivo Messungen mit Mehrfelektroden erfolgreich angewendet werden [192, 193].

Speziell in in-vitro Situationen unter Verwendung von MEA-Systemen kann eine ergänzende optische Untersuchung der Netzwerke zur verbesserten Klassifizierung beitragen. Bei Nutzung von Kalzium- bzw. spannungsabhängigen Farbstoffen sind entsprechende Aktivitäten im neuronalen Netzwerk optisch registrierbar. Allerdings bestehen teilweise Einschränkungen aufgrund der relativ kleinen optischen Signale und der Giftigkeit der verwendeten Farbstoffe. Dennoch ist eine optische Kontrolle von Netzwerkstimulationen aufgrund der dann deutlich größeren elektrischen Spannungen möglich. Klassifikationsansätze können durch die gleichzeitige optische und elektrische Erfassung der Netzwerkaktivität evaluiert werden, da der Aktivitätszeitpunkt und die Position der untersuchten Zelle erfasst werden können [49].

Neben der Verwendung der DWT zur Signaldetektion ist auch eine Nutzung zur Klassifizierung möglich. Die mehrstufige, unterschiedlich skalierte Zerlegung des Eingangssignals erlaubt die Untersuchung der Signalenergie in bestimmten Frequenzbändern zu bestimmten Zeitpunkten, da die *Wavelet*-Basisfunktionen im Frequenz- wie auch im Zeitbereich lokalisiert sind. Die Analyse der Variabilität der entstandenen *Wavelet*-Koeffizienten kann aufzeigen, welche Koeffizienten bestimmte *Spike*-Formen am effektivsten repräsentieren. Durch eine geeignete Veränderung der Koeffizienten kann auch die Signalqualität und somit das Klassifikationsergebnis verbessert werden [163, 194]. Mittels *Wavelet Packet*-Ansatz können vergleichbare Ergebnisse erzielt werden [160, 161]. Die DWT kann auch zur Klassifizierung von sich überlappenden *Spikes* genutzt werden [195]. Man kann zudem zeigen, dass das *Wavelet Packet*-Verfahren in überarbeiteter Form den möglichen zeitlichen Versatz von Aktionspotentialen bei der Klassifikation tolerieren kann [196].

Ein künstliches neuronales Netz kann gleichfalls zur *Unit*-Separation sowie zur Trennung von sich überlagernden Aktionspotentialen verwendet werden. Das Training des KNN kann mit einzelnen sowie überlagerten *Templates*, welche zuvor klassifiziert wurden, durchgeführt werden. Ein wiederholter Vergleich des Ausgabewertes des künstlichen neuronalen Netzes mit dem gewünschten Ergebnis kann ggf. zur Korrektur von Parametern während einer Lernphase genutzt werden [154, 197]. Die Qualität des Trainingsdatensatzes ist dabei von entscheidender Bedeutung für das Klassifikationsergebnis [172]. Neben den meist *Software*-basierten Methoden existieren auch Arbeiten, die u. a. PCA-basierte Klassifikationsverfahren in *Hardware* implementieren [198–200]. Dabei können dann Anforderungen z. B. bezüglich der Leistungsaufnahme berücksichtigt werden.

3.2.3 Ansätze zur Clusterung

Je mehr Merkmale für Klassifizierung zur Verfügung stehen, desto besser können die einzelnen *Spike*-Formen unterschieden werden. Grafische Darstellungen von Punktwolken einzelner Merkmale, so genannte *Scatter Plots*, können Aufschluss über die Eignung einzelner Merkmale für die Klassifizierung geben. Die Bestimmung der Cluster Grenzen kann problematisch sein, wenn die Cluster nicht besonders ausgeprägt sind. Für die manuelle bzw. automatische Bestimmung der Bereichsgrenzen gelten ähnliche Überlegungen wie bei der Festlegung einer Schwellenhöhe zur Detektion von Aktionspotentialen, siehe auch Abschnitt 3.2.1. Bei der *offline* Analyse kann die Festlegung der Cluster Grenzen nach der grafischen Auswertung eines Teils oder der Gesamtheit der bis dahin gesammelten Daten erfolgen. Die Clusterung kann bei stabilen Clustern auch in einer *online* Analyse, also während der Messung, durchgeführt werden [152].

Nach der Identifikation geeigneter Klassifikationsmerkmale ist es notwendig, zweckmäßige Verfahren für die Auswertung der erfassten Daten auszuwählen. Idealerweise sollen durch eine Clusterung bzw. allgemeiner durch eine Klassifizierung der extrahierten *Spike*-Merkmale die Anzahl der gemessenen *Units* pro Sensorelektrode ermittelt werden. Zunächst wird dabei vorausgesetzt, dass eine Gruppe von ähnlichen Aktionspotentialen auch einem Neuron bzw. einer *Unit* zugeordnet werden kann. Der Literatur lassen sich zahlreiche Clusterverfahren entnehmen, wie z. B. *Nearest Neighbour* [201, 202], *K-Means*, ISODATA (*Iterative Self-Organizing Data Analysis Technique*) [189, 203–205], Bayes-basierte Clusterung [206, 207], *Expectation Maximization* [77, 180, 208, 209], hierarchische Clusterung [188, 210, 211] und *Fuzzy C Means* [212, 213].

Unter Clusterung versteht man generell eine Gruppierung von Daten, so dass sich in den Gruppen bzw. Clustern eine geringe Intra-Clustervarianz und zwischen den Gruppen eine hohe Inter-Clustervarianz ergibt. Im Unterschied zur Klassifizierung liegt bei der Clusterung für die untersuchten Muster keinerlei Information zur Klassenzugehörigkeit vor. Einzige Grundlage für die zu ermittelnde Gruppierung während der Clusterung ist das genutzt Distanzmaß zwischen den Objekten. Je nach Aufgabenstellung kann die Anzahl der Cluster vor der Clusterung gegeben werden oder erst das Ergebnis dieses Vorganges sein [214]. Die Klassifikation wendet man im Gegensatz zur Clusterung bei einer bekannten Anzahl von Mustergruppen an. Das Ziel der Klassifizierung ist die Zuordnung neuer Muster zu den bereits bekannten Clustern. Bei der Clusterung werden keine Annahmen bezüglich einer möglichen Anzahl oder der Struktur der Gruppen in einem Datensatz gemacht [215]. Bei der Klassifizierung kann zudem in den einzelnen Untergruppen die Grundlage der Klassifikation, wenn erforderlich, geändert werden. Dagegen verwendet die Clusterung alle Objekte in gleicher Weise [216].

In der Literatur werden nur Klassifikationsverfahren, die nicht überwacht Objekte exklusiv zu einer bestimmten Gruppe zuordnen, als Clusterverfahren bezeichnet. Die so genannten Muster- und Nachbarschaftsmatrizen stellen die Grundlage eines jeden Clusterverfahrens dar. In der Mustermatrix, auch *Pattern Matrix* genannt, erfolgt die Darstellung der zu

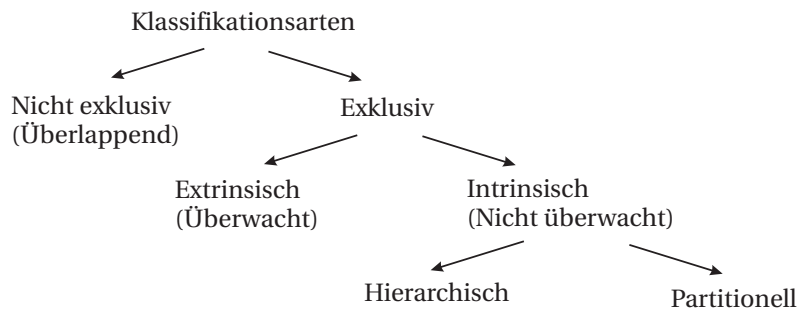


Abbildung 3.1: Klassifikationsarten nach [1]

untersuchenden Objekte mittels ihrer Attribute oder Merkmale. So steht für jedes Objekt ein mehrdimensionaler Merkmalsvektor zur Verfügung. Werden die einzelnen Objekte als Punkte im mehrdimensionalen Raum dargestellt, so kann die Nachbarschaft oder die Nähe zwischen diesen Punkten mit einem Distanzmaß, z. B. als paarweise Euklidische Distanz, ausgedrückt und in der Nachbarschaftsmatrix, auch *Proximity Matrix* genannt, erfasst werden. Alternativ könnten für diesen Zweck auch Korrelationskoeffizienten von paarweisen Mustervergleichen genutzt werden [1].

$$d(i, k) = \left(\sum_{j=1}^d |x_{ij} - x_{kj}|^r \right)^{\frac{1}{r}} \quad (3.1)$$

$$d(i, k) = (x_i - x_k)^T \mathcal{C}^{-1} (x_i - x_k) \quad (3.2)$$

Es werden verschiedene Arten der Klassifikation unterschieden, siehe auch Abbildung 3.1. Zunächst erfolgt die Einteilung in exklusive und nicht exklusive also überlappende Klassifizierung. Im Gegensatz zur exklusiven Klassifizierung kann bei nicht exklusiver Klassifizierung ein Objekt mehreren Klassen zugeordnet werden. Die exklusive Klassifikation kann weiter in extrinsische und intrinsische Klassifizierung aufgegliedert werden. Die intrinsische bzw. nicht überwachte Klassifizierung nutzt lediglich die Nachbarschaftsmatrix als Grundlage für die Klassifikation. Da dieser Ansatz keine a priori Informationen für die Einteilung einzelner Objekte verwendet, spricht man in diesem Fall auch vom nicht überwachten Lernen.

Im Gegensatz dazu benutzt die extrinsische Klassifizierung neben der Nachbarschaftsmatrix auch die a priori bekannten Klassenkennzeichnungen einer Lernmenge. Sie ist also auf einen „Lehrer“ angewiesen. Die wirklich interessante exklusive, intrinsische Klassifikation, also die eigentliche Clusterung, kann dann weiter in eine hierarchische und eine nicht hierarchische Klassifizierung unterteilt werden. Bei einem hierarchischen Ansatz entsteht eine verzweigte Reihenfolge von Aufteilungen aller Objekte. Dagegen erfolgt bei der nicht hierarchischen Klassifizierung lediglich eine einzige Aufteilung aller Objekte entsprechend den gewählten Klassifikationsmerkmalen. Im Folgenden werden lediglich exklusive, intrinsische Klassifikationsansätze betrachtet. Es stehen hierfür verschiedene Implementationsmöglichkeiten zur Verfügung.

So kann die hierarchische Klassifizierung zunächst agglomerativ realisiert werden, indem jedes Objekt einem separaten Cluster zugeordnet wird. Anschließend werden diese Cluster schrittweise zu einem einzigen Cluster vereinigt. Das divisive Verfahren beginnt dagegen mit einem Cluster, der alle Objekte enthält. Diese Objekte werden nachfolgend Teil-Clustern zugewiesen. Weiterhin können die zu klassifizierenden Objekte einzeln nacheinander oder alle gleichzeitig untersucht werden. Gleiches gilt für die auszuwertenden Merkmale der einzelnen Objekte. Schließlich kann der Cluster-Algorithmus mit Hilfe der Graphentheorie bzw. mittels Matrix-Algebra dargestellt werden. In der Graphentheorie erfolgt zur Bewertung der Clusterung eine Untersuchung der Konsistenz des Dendogramms. Alternativ kann z. B. ein bestimmtes Fehlermaß algebraisch ausgewertet werden [1].

$$\rho(j, r) = \frac{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (x_{ij} - m_j)(x_{ir} - m_r)}{s_j s_r} \quad (3.3)$$

Meist dient die Minkowski Metrik als Ähnlichkeitsmaß, um die Distanz d zwischen zwei Punkten für alle Merkmalsdimensionen zu berechnen, siehe Gleichung 3.1. Der Exponent der Metrik erfüllt $r \geq 1$. Die gebräuchlichste Minkowski Metrik wird als Euklidische Distanz bezeichnet und ergibt sich aus $r = 2$. Bei $r = 1$ vereinfacht sich die Metrik zur *Manhattan-* bzw. *City Block-*Distanz. Die Mahalanobis Distanz zwischen zwei Mustern x_i und x_k , siehe Gleichung 3.2, kann auch für die Clusteranalyse genutzt werden. Dabei entspricht \mathcal{C} der Kovarianzmatrix, d. h. die Korrelation zwischen den einzelnen, dann statistisch standardisierten Merkmalen wird berücksichtigt. Der Korrelationskoeffizient ρ zweier Merkmale, siehe Gleichung 3.3, bzw. der Kosinus des Winkel zwischen zwei Merkmalsvektoren entspricht einem nicht metrischen Ähnlichkeitsmaß [217].

$$d_{\min}(D_i, D_j) = \min_{\substack{x \in D_i \\ y \in D_j}} \|x - y\| \quad (3.4)$$

$$d_{\max}(D_i, D_j) = \max_{\substack{x \in D_i \\ y \in D_j}} \|x - y\| \quad (3.5)$$

Hierarchische Clustermethoden als Vertreter der exklusiven und nicht überwachten Verfahren transformieren die *Proximity Matrix* in eine Sequenz ineinander verschachtelter Cluster. Das Ergebnis dieser Aufteilung lässt sich als Dendogramm visualisieren und auswerten. In dieser verzweigten Baumstruktur werden die Cluster bzw. Knoten durch Linien verbunden. Die Länge dieser Linien gibt Aufschluss über den Abstand der Cluster. An geeigneter Stelle kann das Dendogramm aufgetrennt werden, um eine begründbare Menge von einzelnen Clustern zu gewinnen. Während dieser Clusterung können unterschiedliche Methoden zur Aktualisierung der Clusterabstände genutzt werden [1].

Es stehen verschiedene Ansätze zur Verfügung, um den Abstand zwischen zwei Clustern zu erfassen. Diese Ansätze können zu unterschiedlichen Ergebnissen führen, wenn keine kompakten, gut separierten und hypersphärische Cluster vorliegen. Somit können gleiche Clustermethoden zu abweichenden Resultaten führen, da es u. U. zu einer anderen Verschmelzung der einzelnen Cluster kommen kann. Beim *Single Link*-Ansatz wird der Clusterabstand als kürzeste Distanz zwischen beliebigen Elementen der jeweiligen Cluster erfasst, siehe Gleichung 3.4. Die *Complete Link*-Methode geht dabei vom größten Abstand aus, siehe Gleichung 3.5. Ebenso könnte der gemittelte Abstand der Clusterelemente, auch *Average Link* siehe Gleichung 3.6, bzw. der Abstand der Clusterzentren, siehe Gleichung 3.7 genutzt werden [218].

$$d_{avg}(D_i, D_j) = \frac{1}{n_i n_j} \sum_{x \in D_i} \sum_{y \in D_j} \|x - y\| \quad (3.6)$$

$$d_{mean}(D_i, D_j) = \|m_i - m_j\| \quad (3.7)$$

Die nicht hierarchische Clusterung, auch *Partitional Clustering*, als weiterer nicht überwachter Ansatz, nimmt eine einzige Aufteilung der Objekte vor. Dabei soll die natürliche Gruppierung der Daten gefunden werden. Die Daten sollten hierfür in der *Pattern Matrix* vorliegen. Es wird eine Aufteilung der Objekte gesucht, bei der die Muster innerhalb eines Cluster ähnlicher als im Vergleich zu anderen Clustern sind. Ein lokales oder globales Kriterium ist für diese Clusterung erforderlich. Bei einem lokalen Kriterium wird die lokale Datenstruktur wie z. B. Regionen höherer Dichte genutzt. Bei einem globalen Kriterium wird jeder Cluster durch einen Prototypen repräsentiert. Eine Zuordnung der Objekte erfolgt dann aufgrund ihrer Ähnlichkeit mit diesen Prototypen. Mögliche Schwierigkeiten umfassen die Auswahl eines geeigneten Clusterkriteriums, die Untersuchung aller möglichen Aufteilungen der Muster in eine Anzahl Cluster sowie die dafür erforderlichen Ressourcen. Aufgrund des Fehlens einer präzisen Definition bezüglich der Form und der Größe möglicher Cluster existiert kein einzelnes, am besten geeignetes Kriterium [1].

Die am häufigsten genutzte Strategie für die partielle Clusterung beruht auf dem Kriterium des quadratischen Fehlers. Das Ziel ist das Finden der Aufteilung von Objekten, die für eine feste Clusterzahl den quadratischen Fehler minimiert. Die Minimierung des quadratischen Fehlers bzw. die Reduzierung der Variation innerhalb eines Clusters ist identisch mit der Maximierung der Variation zwischen den verschiedenen ermittelten Clustern. Der quadratische Fehler für einen Cluster C_k ergibt sich gemäß Gleichung 3.8 aus der Summe der quadrierten Euklidischen Distanzen zwischen jedem Clusterelement und dem Clusterzentrum. Alternativ wird auch die Mahalanobis Distanz genutzt. Der quadratische Fehler der kompletten Clusterung ergibt sich aus der Summe der quadratischen Fehler der einzelnen Cluster [217]. Verwandte Clusterkriterien werten die Varianz bzw. die Streuung der einzelnen Cluster aus [218].

Die populäre *K-Means*-Clustermethode wendet das Kriterium des quadratischen Fehlers an. Nach Festlegung von K Startpunkten werden die verbleibenden Muster entsprechend des Fehlerkriteriums dem nächsten Clusterzentrum zugeordnet. Durch wiederholte Clustering bei unterschiedlicher Lage der gewählten Startpunkte kann die Konvergenz des Verfahrens verbessert werden. Das ISODATA-Verfahren wendet ebenso das quadratische Fehlerkriterium an. Nach vorgegebenen Parametern können mit diesem Ansatz unter bestimmten Bedingungen Cluster neu geschaffen bzw. miteinander vereint werden [217].

$$e_k^2 = \sum_{i=1}^{n_k} (x_{ik} - m_k)^T (x_{ik} - m_k) \quad (3.8)$$

Es existieren zudem eine Reihe wahrscheinlichkeitsbasierter Verfahren zur Clustering von Daten. Ein Ansatz für die nicht hierarchische und nicht überwachte Clustering beruht auf der Parameterabschätzung von Verteilungsdichten der zu untersuchenden Muster, wobei die Formen und die Anzahl der zugrunde liegenden Populationsdichten bekannt sind. Bei dem auch als *Mixture Decomposition* bezeichneten Verfahren soll ein Muster der passenden Population zugeordnet werden. Die Wahrscheinlichkeitsdichtefunktionen $p(x|\omega_i, \theta_i)$ der einzelnen Klassen ω_i überlagern sich zur Mischverteilung $p(x|\theta)$ gemäß Gleichung 3.9.

$$p(x|\theta) = \sum_{i=1}^k p(x|\omega_i, \theta_i) P(\omega_i) \quad (3.9)$$

Mithilfe der noch nicht klassifizierten Muster, den bekannten Klassenwahrscheinlichkeiten $P(\omega_i)$ für alle k Klassen und den vorhandenen, klassenabhängigen Wahrscheinlichkeitsdichten $p(x|\omega_i, \theta_i)$ sollen nun die unbekannt Parametervektoren θ_i abgeschätzt werden, um die Mischverteilung $p(x|\theta)$ in ihre einzelnen Komponenten zu zerlegen [217]. Unter der Voraussetzung, dass die einzelnen Wahrscheinlichkeitsdichten identifiziert werden können, ist eine nicht überwachte Schätzung des unbekannt Parametervektors θ z. B. mittels *Maximum Likelihood*-Verfahren oder dem Bayes-Ansatz im Prinzip möglich. Man kann den *K-Means*-Algorithmus als ein angenähertes Verfahren zur Abschätzung der maximal wahrscheinlichen, unbekannt Mittelwerte einer Mischverteilung auffassen [218].

Eventuell vorhandenes a priori Wissen kann bei *Maximum Likelihood*-Ansätzen genutzt werden, um geeignete Ausgangspunkte für die Parameterschätzung zu identifizieren. Eine Alternative dazu stellt das Bayes-basierte, nicht überwachte Verfahren dar. In diesem Fall wird θ als eine Zufallsvariable mit einer bekannten Verteilung $p(\theta)$ aufgefasst. Mit einer nicht klassifizierten Menge D von Mustern wird nun die Dichte $p(\theta|D)$ berechnet. Dieser Ansatz ist eng mit dem überwachten Bayes-Lernen verwandt. Unter Nutzung der Klassenwahrscheinlichkeit $P(\omega_i)$ und den klassenabhängigen Wahrscheinlichkeitsdichten $p(x|\omega_i, D)$ ergibt sich die Merkmalswahrscheinlichkeit $P(\omega_i|x, D)$ gemäß Gleichung 3.10. Der unbekannt Parameter θ wird dabei gemäß Gleichung 3.11 berücksichtigt [218].

$$P(\omega_i|x, D) = \frac{p(x|\omega_i, D)P(\omega_i)}{\sum_{j=1}^k p(x|\omega_j, D)P(\omega_j)} \quad (3.10)$$

$$p(x|\omega_i, D) = \int p(x, \theta|\omega_i, D)d\theta \quad (3.11)$$

Expectation Maximization entspricht einer Klasse verwandter Algorithmen zur Schätzung maximal wahrscheinlicher Parameterschätzungen, siehe auch *Maximum Likelihood*-Verfahren. Ausgehend von einem unvollständigen Datensatz X wird ein vollständiger Datensatz $Z = (X, Y)$ mit einer Dichte- und Wahrscheinlichkeitsfunktion angenommen. Zunächst kann mittels der beobachteten Werte X und der momentanen Parameterschätzung $\theta^{(i-1)}$ der Erwartungswert E der logarithmierten Wahrscheinlichkeit des gesamten Datensatzes hinsichtlich der unbekanntenen Werte Y bestimmt werden, siehe auch Gleichung 3.12. Die neuen Parameter θ werden anschließend optimiert, um gemäß Gleichung 3.13 Q zu erhöhen. Die beiden Schritte können falls erforderlich wiederholt werden. Nach jedem Schritt konvergiert der Algorithmus in Richtung des lokalen Maximums der Wahrscheinlichkeitsfunktion [219].

$$Q(\theta, \theta^{(i-1)}) = E \left[\log \left\{ p(X, Y|\theta) \mid X, \theta^{(i-1)} \right\} \right] \quad (3.12)$$

$$\theta^i = \underset{\theta}{\operatorname{argmax}} Q(\theta, \theta^{(i-1)}) \quad (3.13)$$

$$\hat{p}_n(x) = \frac{k_n/n}{V_n} \quad (3.14)$$

Ein weiteres Clusterverfahren beruht auf der nicht parametrischen Abschätzung der Dichte im Musterraum. Mithilfe der Dichteschätzung und der anschließenden Auswertung, auch *Mode Seeking*, können Regionen hoher Dichte identifiziert werden. Diese Regionen können dann als Clusterzentren für die weitere Klassifizierung dienen. Das Ergebnis der Wahrscheinlichkeitsdichteschätzung $\hat{p}_n(x)$ an einem Punkt x ist dabei proportional zur Anzahl der Muster k_n die in ein bestimmtes Volumen V_n um diesen Punkt x fallen, siehe auch Gleichung 3.14. Die Variable n entspricht der Gesamtanzahl der untersuchten Muster. Die kritische Wahl des Volumens V_n kann mittels *Parzen Window*- bzw. *Nearest Neighbour*-Methode erfolgen. In beiden Fällen ist V_n umgekehrt proportional zu \sqrt{n} . Dieser Ansatz kann unimodale Cluster mit beliebiger Form erkennen. Es müssen aber genügend Muster zur Verfügung stehen. In Abhängigkeit der gewählten Volumengröße können die Dichteabschätzungen zudem sehr rauschbehaftet bzw. übermäßig geglättet sein [217].

Beim *Partitional Clustering* mittels Graphentheorie werden im Gegensatz zur hierarchischen Clustering die zu untersuchenden Objekte als Punkte im Raum dargestellt. Der zu

konstruierende Graph verbindet die Knoten, also die Objekte, mittels Kanten. Die Kanten können dabei als Distanz zwischen den einzelnen Objekten interpretiert werden. Die Struktur des Graphs kann nun auf Gruppierungen der Knoten hin untersucht werden. Geeignete Methoden zerlegen dazu den Graph in einzelne Komponenten bzw. Cluster indem inkonsistente Kanten entfernt werden. Dieses Verfahren ist eng mit der *Nearest Neighbour*-Methode verwandt. Zwei Muster können demnach als ähnlich angesehen werden, wenn sie sich ihre Nachbarn teilen. Ein Objekt sollte sich dann in gleichen Cluster wie sein nächster Nachbar befinden.

Bei kompakten Clustern kann die eindeutige, exklusive Zuordnung von Objekten zu bestimmten Clustern relativ einfach erfolgen. Im Falle sich berührender oder überlappender Clustergrenzen kann diese Zuordnung problematisch werden. Mittels *Fuzzy*-Klassifikatoren kann in diesem Fall jedem Muster einen Grad der Mitgliedschaft in bestimmten Clustern zugewiesen werden. Im Gegensatz zu wahrscheinlichkeitsbasierten, statistischen Klassifikationsverfahren können die Muster bei einem *Fuzzy*-Ansatz gleichzeitig mehreren Clustern angehören [217].

Speziell bei der *online* Clusterung können unter der Annahme einer Clusterzahl und eines Kriteriums instabile, driftende Cluster entstehen. Das Verfahren muss dann adaptiv ausgerichtet sein, um ggf. die Einrichtung neuer Cluster zu ermöglichen. Andererseits kann die Interpretation einer instabilen Clusterung schwierig sein. Dieses Problem ist unter der Bezeichnung *Plasticity-Stability*-Dilemma in der Literatur bekannt. Mit dem Verfahren des *Competitive Learning* kann die Instabilität reduziert werden, da nur noch der Cluster aktualisiert wird, welcher dem letzten Muster am ähnlichsten war. Verfahren der künstlichen neuronalen Netze können hier Anwendung finden [218].

Die potentiell unbekannt Anzahl von Clustern in einem Datensatz ist ein weiteres zentrales Problem für die *online* Clusterung. Einmal kann ein bestimmtes Problem unter der Berücksichtigung einer unterschiedlichen Clusterzahl wiederholt untersucht und die Lösung ausgewertet werden. Speziell für eine *online* Implementierung ist die Nutzung einer Schwelle zur Einrichtung eines neuen Clusters geeigneter. Dieses Verfahren kann aber in Abhängigkeit der Reihenfolge der präsentierten Daten zu unterschiedlichen Ergebnissen führen. Zudem kann das Finden einer geeigneten Schwelle problematisch sein, da dafür keine allgemeinen Richtlinien existieren. Das Vereinigen von ausreichend ähnlichen Clustern stellt eine weitere Herausforderung dar [218].

Eine Bewertung bestimmter Clusteransätze in Bezug auf ihre Eignung ist relativ schwierig. Vergleichende Studien betrachten eine unterschiedliche Anzahl und Arten von Verfahren, die zudem unterschiedlich implementiert sein können. Die künstlichen Datensätze wurden außerdem verschiedenartig generiert. Ein theoretischer Vergleich von Clusteralgorithmen ist meist nicht möglich, da diese Verfahren nicht in geeigneter Form mathematisch modelliert werden können. Die Schwierigkeit einer generellen Clusterdefinition sowie unterschiedliche Namen für identische Clustermethoden bereiten zusätzliche Probleme. Da es keinen besten, allgemein gültigen Clusteransatz gibt, sollten mehrere Verfahren auf einen gegebenen Datensatz angewendet und ausgewertet werden [217].

3.2.4 Verfahren zur offline Klassifikation

Eine *online* Detektion mit einer Speicherung der *Spikes* für die nachfolgende *offline* Analyse kann sinnvoll sein, da so die *User*-Interaktion während des Experimentes reduziert werden kann. Prinzipiell können damit auch eine höhere Anzahl von Sensorelektroden untersucht werden. Nach Abschluss der Messungen können Sortieralgorithmen auf die Datensätze angewendet werden. Die Merkmale des gesamten Datensatzes können ermittelt werden und müssen nicht aus einer zeitlich begrenzten Lernphase abgeschätzt werden. Dieser Ansatz erfordert aber eine größere Bandbreite für den Datentransfer und umfangreichere Speicher zur Archivierung [220]. Alternativ können auch Kompressionsalgorithmen zur Datenreduzierung genutzt werden. Die DWT bietet sich in diesem Zusammenhang an. In Abhängigkeit von der gewählten Kompressionsrate kann aber der Informationsverlust eine Detektion von Aktionspotentialen erschweren [221].

Unabhängig von der Art der Realisierung eines Verfahrens, z. B. *offline*, *online*, überwacht oder nicht überwacht, wird bei den meisten Ansätzen eine Gliederung der Analyse in eine Lernphase, die Detektion und die eigentliche Klassifizierung berücksichtigt. Eine Kombination von Detektion und Klassifizierung ist möglich. Nach der Identifizierung von Aktionspotentialen kann innerhalb der Lernphase die Bestimmung der detaillierten Klassifikationsparameter erfolgen. Hierbei können im Gegensatz zu *online* Verfahren die Informationen des gesamten Datensatzes genutzt werden. Es können alle potentiellen *Units* erfasst werden. Eine Analyse aller Messwerte in mehreren Durchgängen ist möglich.

Bei *Template Matching* erfolgt innerhalb der Lernphase die Bestimmung der *Templates* und ihrer Toleranzen [169, 188, 222–225] bzw. eine Abschätzung der zu nutzenden Clustergrenzen [54, 226–228]. Eine ähnliche Verfahrensweise wird ebenso beim Training eines KNN [223, 229] angewendet. Auch bei der Benutzung von wahrscheinlichkeitsbasierten Bayes-Klassifikatoren findet zunächst eine Abschätzung der Form, der Häufigkeit und der Verteilung der einzelnen *Spikes* statt [153, 206–208, 230]. Durch den möglichen iterativen Ansatz können bereits klassifizierte Signale aus dem Datensatz bzw. aus der gewählten Darstellungsform entfernt werden, um die Klassifizierung von *Spikes* anderer Amplitude [54, 188, 227], die Auflösung von zeitlich überlappenden Kurvenformen [188, 206], die Analyse des Hintergrundrauschens zu ermöglichen [207] bzw. generell Berechnungsfehler bei der Klassifikation zu minimieren [211].

Während der Lernphase können automatisierte Verfahren bei der Bestimmung der etablierten Klassifikationsparameter helfen, eine abschließende Bewertung dieser Parameter erfolgt dann aber meist durch den Anwender. Speziell bei Verfahren des *Template Matching* lässt sich die *Template*-Generierung relativ einfach mittels Ähnlichkeitsmaßen und vorgegebenen Grenzwerten automatisieren [222, 223]. Alternative, automatisierte Ansätze für die EM (*Expectation Maximization*)-Klassifikation existieren ebenfalls [180, 206]. Das Aufstellen allgemeiner Richtlinien zur optimalen Wahl von Klassifikationsparametern ist aufgrund der unterschiedlichen Herangehensweise einzelner Labore schwierig. Selbst wenn nur wenige Parameter für eine Klassifikation erforderlich sind, entsteht schnell eine große Vielfalt

an Kombinationsmöglichkeiten einzelner Parametergrößen, die eine umfangreiche Interaktionen durch den Anwender [228] bzw. entsprechende Ressourcen für die automatisierte Auswahl einer optimalen Parameterkombination für das konkrete Klassifikationsproblem erfordern können [231].

Generell erfolgt die Auswertung der Klassifizierung unter der Annahme, dass eine Klasse von ähnlichen Aktionspotentialen auch einer *Unit* entspricht. Besonders bei komplexen *Bursts* oder veränderlichem Rauschen trifft diese Annahme nicht mehr zu. Aufgrund der im Vergleich zu *online* Verfahren größeren Datenmenge können nun auch umfangreichere Auswertungen erfolgen. Neben der Form der Aktionspotentiale kann man zusätzliche Informationen wie ISI-Histogramme nutzen, um die Beziehungen der einzelnen Klassen zueinander zu bestimmen. Falls erforderlich können dann einzelne *Spike*-Klassen zu einer Gruppe zusammengefasst und als eine *Unit* interpretiert werden. Es können so auch allgemeinere Clusterformen untersucht werden, in dem man nicht mehr von den oftmals vorausgesetzten sphärischen Cluster ausgeht [152, 210, 232].

3.2.5 Verfahren zur online Klassifikation

Die Anwendung von Verfahren der *online* Klassifikation ermöglicht eine starke Reduzierung der anfallenden Daten und gestattet somit eine einfachere Verwaltung und eine Reduzierung der benötigten Ressourcen. Es erfolgt eine zeitnahe Rückmeldung bezüglich des Verlaufes eines Experimentes z. B. mittels Informationen zum Verhalten der sortierten *Units*. Allerdings besteht die Gefahr eines potentiellen Datenverlustes, wenn nur das Klassifikationsresultat gespeichert wird. Aussagen zu möglichen Driften, zum Rauschverhalten und zum Entstehen von neuen bzw. dem Verlust bereits erfasster *Units* während des Experimentes können dann problematisch werden. Zudem erfordert die manuelle Kontrolle der einzelnen Sensorelektroden eines MEA einen enormen zeitlichen Aufwand. Aus diesen Gründen kann die Evaluation der Ergebnisse einer *online* Klassifikation von in der Regel aufwändigen Experimenten schwierig sein [220]. Dennoch ist es wünschenswert das Resultat eines Experimentes schnellstmöglich auswerten zu können. Diese Rückmeldung kann zur zügigen Anpassung des Verlaufes einer Messung genutzt werden. Besonders bei Langzeitmessungen und Stimulationsexperimenten ist eine *online* Analyse der Messergebnisse entscheidend [233].

Analog zu den Ausführungen im Abschnitt 3.2.4 werden auch *online* Verfahren in eine Lernphase, die Detektion und die eigentliche Klassifizierung unterteilt. Eine Kombination einer *offline* durchgeführten Lernphase mit der nachfolgenden *online* Detektion und Klassifizierung von Aktionspotentialen nach dem Prinzip des *Template Matching* ist durchaus möglich [155]. Innerhalb einer Lernphase können die geeigneten Merkmale bzw. *Templates* bestimmt werden, die für die nachfolgende Detektion und Klassifizierung besonders qualifiziert sind. Es können entweder alle Abtastwerte eines Aktionspotentials [201, 234, 235], eine reduzierter Auswahl geeigneter Abtastwerte [189, 204, 205], besondere Merkmale des Aktionspotentials wie Amplitude und Zeitdauer [159] oder als Ergänzung die PCA [186]

genutzt werden. Es existieren auch Parallelen bei alternativen Ansätzen wie z. B. der Verwendung von KNN. Zur Vorbereitung der Sortierung von *Spikes* muss das KNN in einer Lernphase mit geeignetem Datensatz trainiert [154, 172, 236] bzw. die notwendigen Klassifikationsparameter ermittelt werden [237].

Zur Optimierung der Klassifikationsphase wird meist eine manuelle Überprüfung der Höhe der Detektionsschwelle, der gewählten *Templates* und ihrer Toleranzen [24, 32, 186, 235, 238–240], der Cluster Grenzen [155, 201, 241], der Vorgabe der Größe [189, 204] bzw. der Elemente [159] des Merkmalsvektors bzw. die Vorgabe eines Trainingsdatensatzes [154] in der Lernphase notwendig. Eine deutliche Verbesserung dieses Prinzips kann durch halbautomatische Methoden zur *Template*-Generation mit reduzierter Anwenderinteraktion erzielt werden [176, 182, 240, 242]. Nach Abschluss der Lernphase und der Bestimmung der benötigten Klassifikationsparameter erfolgt in der Regel eine automatische *Unit*-Separation der nachfolgend detektierten Aktionspotentiale. Bei kleinem SNR kann aber auch eine Überwachung der Klassifikationsphase sinnvoll sein [172].

Die Anwendung einer Lernphase kann auch zu bestimmten Problemen führen. Prinzipiell können in der einfachsten Form nur *Units* klassifiziert werden, die während der Lernphase auch aktiv sind. Weiterhin können Klassifikationsfehler auftreten, wenn sich die Form der Aktionspotentiale im Verlauf des Experimentes ändert. Eine Lösung kann hier die Berechnung eines Distanzmaßes zwischen allen bereits vorhandenen *Templates* und dem aktuellen *Spike* sein. Ein Vergleich dieser Distanz mit rauschabhängigen Schwellwerten entscheidet, ob und wie das Aktionspotential klassifiziert wird. Möglicherweise kann auch die Einrichtung einer neuen Klasse erforderlich sein. Ferner kann die Aktualisierung des genutzten *Template* nach einer Einordnung zu Schwierigkeiten führen. Die Beurteilung der so entstandenen Cluster beruht erneut auf teilweise subjektiven Kriterien [182]. Mit zunehmender Leistungsfähigkeit der eingesetzten *Hardware* und *Software* für die Signalverarbeitung kann die Anzahl der parallel erfassten Sensoren stetig erhöht werden. Dennoch können die für eine *online* Auswertung benötigten Ressourcen z. B. bei in-vivo Anwendungen enorm sein [243].

3.2.6 Frei verfügbare Ansätze

In zunehmenden Maße stellen *Software*-Entwickler die Ergebnisse ihrer Forschungsarbeiten bezüglich der Analyse neuronaler Daten auch anderen Anwendern zur Verfügung. In diesem Zusammenhang können eine ganze Reihe möglicher Verfahren zur Datenverwaltung und Visualisierung sowie zur Clusterung und Klassifikation genutzt werden. Neben einigen speziellen Lösungen z. B. für die Detektion von *Spike*-Formen [244] und für die Klassifizierung von Aktionspotentialen [160, 208] stehen auch ganze Programmpakete für verschiedene Aufgaben zur Verfügung. Einzelne Verfahren können auch unter den Bedingungen von *OpenSource* bezogen und weiterentwickelt werden. Diese Übersicht erhebt keinen Anspruch auf Vollständigkeit.

MEA-Tools ist ein MATLAB[®] (*MATrix LABoratory*)-basiertes, speziell für MEA-Anwendungen entwickeltes *Software*-Paket zur Analyse von Aktions- und Feldpotentialen sowie von kontinuierlicher neuronaler Aktivität. Neben der Verwaltung und Visualisierung von Daten gestattet es auch eine *offline* Klassifikation von Aktionspotentialen [245]. Der *Spike-Manager* ist ein ähnliches für MATLAB[®] entworfenes Programm, welches speziell für eine *offline Spike*- und *Burst*-Detektion in MEA-Daten gedacht ist. Die Aktionspotentiale können aus einem Datenstrom extrahiert und anschließend verschiedene Aktivitätsparameter für eine statistische Auswertung gewonnen werden. Neben einer Verwaltung der Daten ermöglicht der *Spike-Manager* auch die Visualisierung der Ergebnisse [246]. Mit dem EEGLAB wurde eine weitere MATLAB[®]-*Toolbox* speziell zur Untersuchung von EEG (Elektroenzephalogramm)-Daten geschaffen [247].

Mit *SpikeOMatic* steht ein freies *Software*-Paket für die *offline* Detektion und Klassifikation von Aktionspotentialen zur Verfügung. Die Klassifikation mittels statistischer Ansätze beruht auf der Annahme einer Gauß-Mischverteilung der Daten bzw. auf der Anwendung von *Hidden Markov*-Modellen. *SpikeOMatic* besteht aus einer Kombination von C-Code und Routinen für die freie, statistische Datenanalyseumgebung R [248]. Das C/C++-Programm *neurALC* für die Analyse von Multielektroden Daten ermöglicht die *offline* Untersuchung einzelner Sensorelektroden bzw. die Analyse eines mehrkanaligen Datensatzes. Die Klassifikation nutzt die Zeitinformationen des PSTH (*Post-Stimulus Time Histogramm*), die PCA sowie das nicht überwachte Clusterverfahren *KlustaKwik*. Alternativ kann die *Software NEV2lkit* für die *Unit*-Separation genutzt werden [249, 250].

Die Umgebung *NEV2lkit* stellt ein Werkzeug zur Vorverarbeitung von intrazellulären und extrazellulären Messdaten dar. Es gestattet die *offline* Detektion von *Spikes* aus einer kontinuierlichen Messung. Die *offline* Klassifizierung der Daten beruht auf einer Dimensionsreduzierung mittels PCA und der Anwendung des *KlustaKwik*-Verfahrens zur Merkmalsclustering [251]. Das Echtzeit-fähige LINUX-basiertes Programmpaket *MEABench* ermöglicht die kontinuierliche Datenerfassung in Echtzeit für die anschließende *offline* Klassifizierung. Wichtige Schwerpunkte sind dabei die *online* Unterdrückung von Stimulusartefakten sowie die Visualisierung der Daten in Echtzeit. Neben einer Exportfunktion für MATLAB[®] besitzt es auch Schnittstellen zur Funktionserweiterung [233, 252].

Das Paket *DataMunch* kann zum Austausch und zur Verwaltung von neurophysiologischen Daten unterschiedlichen Ursprungs genutzt werden. Neben der Visualisierung der neuronalen Aktivität und des Verhaltens des Versuchstieres kann auch eine statistische Auswertung der Messungen mit einer *offline* Analyse vorgenommen werden [253]. Das Konsortium *Neuroshare* hat sich die Entwicklung von offenen Programmbibliotheken, Dateiformaten sowie von *Software* zur Datenverwaltung zum Ziel gesetzt. Auch der Datenaustausch mit etablierten Analyseprogrammen, wie z. B. MATLAB[®], LabVIEW[®] (*Laboratory Virtual Instrumentation Engineering Workbench*) oder *NeuroExplorer*, sowie die Bereitstellung von Klassifikationsmöglichkeiten wird angestrebt. Das Projekt befindet sich noch in der Entwicklungsphase [254].

Eine von *R.C. Electronics Inc.* entwickelte MATLAB[®]-*Toolbox* namens *Neuromax* erlaubt die *offline* Analyse mehrkanaliger Multielektrodensignale. Der angestrebte Umfang umfasst die *Spike*-Klassifikation, die Identifizierung von sich überlagernden Aktionspotentialen, die Auflösung dieser Überlagerungen, die metrische Bestimmung und die Auswertung der Klassifikationsgenauigkeit. Zudem soll der Datenaustausch zwischen verschiedenen Forschergruppen erleichtert werden. Derzeit erfolgt noch die Testung [255]. Die Programm-Bibliothek *BioSig* wurde speziell für die Verarbeitung von z. B. Elektroenzephalogrammen und Elektrokardiogrammen entworfen. Die Bibliothek kann unter Octave, MATLAB[®], C/C++ und Python genutzt werden und ermöglicht neben der Datenverwaltung auch eine Merkmalsextraktion und eine *offline* Klassifikation [256].

Das Programm *DATA-MEAns* dient der *offline* Analyse von elektrophysiologischen Daten, welche mittels Multielektrodensystemen aufgenommen wurden. Die *Software* wurde in Delphi implementiert, wobei auch MATLAB[®]-Funktionen aufgerufen werden. Neben der Klassifikation von *Spikes* kann auch die Darstellung zeitlich-räumliche Netzwerkaktivität erfolgen. Die Klassifikation nutzt dabei *NEV2lkit* zur PCA-basierten *Unit*-Separation [257]. Der in C entwickelte *Spiker* ermöglicht die *offline* Analyse von extrazellulären Tetrodenmessungen. Nach der *Spike*-Detektion kann eine manuelle Clusterung basierend auf der Amplitude der Aktionspotentiale folgen. Eine Weiterentwicklung bzw. Portierung der *Software* kann allerdings problematisch sein, da die verwendete Plattform-unabhängige Entwicklungsumgebung nicht mehr erhältlich ist [258].

Neben den bisher vorgestellten Entwicklungen existieren auch Verfahren, die sich auf die Clusterung von Daten konzentrieren. *KlustaKwik* ist eine für einen Vergleichstest entwickelte Cluster-*Software* zur automatischen, nicht überwachten Sortierung von neuronalen Aktionspotentialen [170]. Das Verfahren beruht auf der Annahme einer Gaußschen Mischverteilung der Daten und kann die Anzahl der Mischkomponenten ermitteln. Es können auch Parameter z. B. bezüglich der erwarteten Clusterzahl übergeben werden. Durch eine regelmäßige Überprüfung eines geeigneten Teilens oder Verschmelzens von gefundenen Clustern versucht die *Software* z. B. lokale Minima zu vermeiden und die Anzahl notwendiger Neustarts pro Datensatz zu verringern. Dieser C-*Code* kann auch auf größere Datenmengen angewendet werden [259].

Klusters gestattet die manuelle bzw. halbautomatische Klassifizierung von *Spikes*, die mit Mehrfachelektroden aufgenommen wurden. Es wurde in C realisiert. Neben der Visualisierung und der Datenverwaltung können auch externe Sortierprogramme wie *KlustaKwik* aufgerufen werden [260]. *NeuroScope* kann zur Visualisierung von Feldpotentialen, von neuronalen *Spikes* und von Informationen zum Verhalten des Versuchstieres genutzt werden. *NManager* wiederum dient der Datenverwaltung und -verarbeitung [261]. *MClust* ist ein MATLAB[®]-Programm, mit dem Daten manuell in Cluster eingeteilt werden können. Ein nachträgliches Trennen bzw. Verschmelzen von Clustern ist möglich. Eine teilautomatische Clusterung ist unter Nutzung von *KlustaKwik* bzw. *BubbleClust* möglich [262]. Der S- bzw. R-Ansatz *MCLUST* nutzt mehrere statistische Clusteransätze, wurde aber nicht speziell für neuronaler Daten entwickelt [263, 264].

3.2.7 Kommerzielle Lösungen

Ein wichtiger kommerzieller Anbieter von *Software*-Lösungen zur Konfiguration des Messaufbaus, zur interaktiven Auswertung und Visualisierung der Messdaten sowie zur Datenverwaltung ist die Firma *Multi Channel Systems* [132]. *Plexon Inc.* stellt *Software* für die Klassifikation von Aktionspotentialen sowohl während [265] als auch nach der neuronalen Messung [266] zur Verfügung. Die jeweils manuell und interaktiv durchgeführte *Unit-Separation* basiert meist auf geeignet platzierten Triggerschwellen und Zeit-Spannungsfenstern. Zusätzliche Anwendungen gestatten die Synchronisation von Videodaten und dem gemessenen neuronalen Aktivitätszustand. Vergleichbare Lösungen bieten auch die Firmen *Panasonic* [141], *Alpha Omega Engineering Ltd.* [142], *Cambridge Electronic Design Ltd.* [143], *Neuralynx* [144], *Tucker-Davis Technologies* [145] an. Vielfach sind diese Applikationen nicht nur auf in-vitro Multielektrodenexperimente beschränkt. Eine Liste weiterer Anbieter kann man unter [146] finden.

3.3 Vorläufige Bewertung und Probleme

3.3.1 MEA-Entwicklungen

Bereits seit mehreren Jahrzehnten wird die Herstellung integrierter Schaltkreise, ergänzt um weitere Prozesse, zur Schaffung von z. B. MEMS (*Microelectromechanical System*), μ TAS (*Micro Total Analysis System*), *Lab on a Chip* und anderer Mikrosysteme genutzt. Diese Systeme werden u. a. in der Biologie, Biochemie und Medizin angewendet. Neben der Miniaturisierung und der Integration von Elektronik kann mit diesem Ansatz ein hoher Testdurchsatz, *High Throughput*, bei kleinem Probenvolumen realisiert werden. Messungen können parallelisiert werden. Die geometrische Struktur dieser Systeme kann in weiten Bereichen präzise beeinflusst werden. In Abhängigkeit der Komplexität können lange Entwicklungsperioden zur Systemrealisierung erforderlich sein. Des Weiteren können Strukturen oder verwendete Materialien für bestimmte Anwendungen ungeeignet sein [267].

Aufgrund des bisherigen Mangels geeigneter optischer Verfahren zur Beschreibung metabolischer und elektrophysiologischer Zellgrößen scheint eine Ergänzung durch mikroelektronische Ausleseverfahren sinnvoll zu sein. Neben der Silizium-basierten Halbleitertechnologie wurden auch Keramik- und Glas-Substrat basierte Dünnschichtmethoden bei der Realisierung von Sensorchips entwickelt. Der Einsatz von Dünnschicht- und Siebdruckverfahren ist besonders bei Anwendungen mit hohen Stückzahlen sinnvoll. Glas-Substrate ermöglichen zudem den kontrollierenden Einsatz von Mikroskopen. Mit der Halbleitertechnologie können dagegen eine hohe Sensordichte und kleine Sensorstrukturen erzielt werden. Aufgrund des relativ großen Aufwandes kann die Herstellung Halbleiter-basierter Sensorchips auch bei großen Stückzahlen relativ kostenintensiv sein [268].

Lab on Chip-Systeme erlauben die Erfassung komplexer Zellreaktionen. Aufgrund der Miniaturisierung dieser Sensoren werden vergleichsweise wenige Zellen und geringe Mengen an Testsubstanzen benötigt. Vielfältige Sensortypen mit Signalkonditionierung können in diese Chips integriert werden. Bei längeren Messungen ist ein Mikrofluidiksystem für die Lebenserhaltung der Zellkultur erforderlich. Es kann gleichzeitig zur Applizierung von Testsubstanzen dienen. Bei der Herstellung Silizium-basierter Chips kann eine Abweichung von standardisierten Herstellungsprozessen z. B. zur Verbesserung der Zellanhaftung und zur Gewährleistung der Biokompatibilität nötig sein. Die Langzeitstabilität integrierter Sensoren kann problematisch sein [36]. Speziell für die Messung elektrophysiologischer Signale kommen neben passiven Mikroelektroden auch FET-Sensoren zum Einsatz, deren Rauschniveau aber deutlich höher ausfallen kann [113, 119].

Typische MEA-Systeme bestehen aus einem Sensorarray mit externer Signalkonditionierung und Systemkontrolle. Diese diskrete Elektronik verstärkt die Sensorsignale und begrenzt gleichzeitig die mögliche Arraygröße. Die Integration von zusätzlicher Elektronik auf dem Chip ist für größere MEAs zwingend. Chips mit einer hohen Sensordichte können aufgrund der begrenzten Fläche für die Verstärker aber ein relativ hohes Rauschniveau besitzen [269]. Die Messung extrazellulärer Potentiale mittels planarer MEA benötigt eine Elektrodengröße, welche vergleichbar zur Größe der verwendeten Zellart ist. Wenn eine Elektrode deutlich größer als die zu untersuchende Zellen ist, kommt es aufgrund der Elektrodenfläche, die Kontakt zum leitenden Medium besitzt, zu einer Spannungsteilung und damit zu einer Reduzierung des Messsignals. Das Signal zu kleiner Elektroden wird dagegen von Johnson-Rauschen dominiert [270]. Der durchschnittliche Anteil von Elektroden eines MEAs mit messbarer neuronaler Aktivität liegt bei ca. 29,5 % [47].

Auf MEAs werden oft Zellen kultiviert, die eine zusammenhängende Zellschicht, so genannte *Monolayer*, ausbilden. Diese können das ganze Array mit Zellen bedecken. Embryonale und Tumorzellen eignen sich deshalb besonders [271]. Es lassen sich vielfältige neuronale Gewebe auf MEAs kultivieren. Meist werden jedoch dissoziierte primäre Neuronen verwendet [270]. Dissoziierte primäre Herzmuskelzellen bilden meist mechanisch und elektrisch miteinander verbundene Zellschichten aus, weshalb sich wandernde Depolarisationsfronten über dem Array beobachten lassen. Das synchrone Verhalten der Herzmuskelzellen produziert zusammengesetzte Aktionspotentiale mit größeren Amplituden. Neuronale Aktionspotentiale stammen gegen von individuellen Zellen [270]. Neben einzelnen Herzmuskelzellen lassen sich auch deren Aggregate kultivieren. Auch sie können sich zu einer Schicht verbinden, in der sich dann ein *Pacemaker* durchsetzt [272].

Einzelne Elektroden eines MEA können beträchtliche Unterschiede bezüglich ihrer Impedanz, der Zellanhaftung und des Langzeitverhaltens aufweisen, wodurch die Messung der neuronalen Aktivität beeinflusst werden kann [102]. Eine bedeutende Variation der Zell-Elektroden-Kopplung kann nicht nur von Experiment zu Experiment sondern auch bei unterschiedlichen Chipchargen, einzelnen Chips einer Charge und Elektroden eines Chips auftreten. Die angewendeten Zellkulturtechniken sowie die bei der Kultur genutzten Oberflächen können einen zusätzlichen Einfluss auf die Messung haben. Robuste Verfahren der

Signalauswertung besitzen aufgrund dieser Variabilität eine besondere Bedeutung [270]. Messergebnisse können mit bestimmten Elektrodenformen [273], der Beeinflussung der Zell-Elektrodenkopplung mittels Substratbeschichtung [92] bzw. mittels Oberflächengestaltung [274, 275] verbessert werden.

Theoretische Untersuchungen zeigten, dass das extrazellulär an einer Nervenzelle gemessene Signal in leitendem Medium nahe der aktiven Zellmembran der zweiten Ableitung des intrazellulären Spannungssignals bezüglich der Zeit zugeordnet werden kann. Das Messsignal kann durch die Impedanz des Zell-Elektroden-*Interface* in der Praxis so beeinflusst werden, dass es Ähnlichkeit mit der dritten Ableitung nach der Zeit aufweist [101]. Obwohl das extrazelluläre Signal synchron zum Aktionspotential auftritt, stimmt es nicht mit seiner Form überein. Die Ursachen dafür sind noch nicht vollständig geklärt [276]. Bei Einbeziehung der gesamten Oberfläche des Neurons lassen sich die mit einem planaren MEA messbaren Aktionspotentiale als eine Zusammensetzung aus dem intrazellulären *Spike*, seiner ersten und zweiten Ableitung nach der Zeit modellieren. Schichten von Gliazellen können weitere Ableitungen dieses Signals verursachen [277].

Nervenzellen einiger invertebrater Tiere sind im Vergleich zu vertebraten Tieren größer und einfacher handhabbar. Gedächtnis und Lernfähigkeit sind aber eher mit Wirbeltieren assoziiert, welche ein zentrales Nervensystem und ein Gehirn aufweisen. Die Messung extrazellulärer Signale dieser vertebraten Neuronen besonders in schwach besetzten Netzwerken ist deutlich schwieriger. Neben der Unkenntnis der optimalen Wachstumsbedingungen dieser Netzwerke wäre auch die Möglichkeit der Migration von Ionenkanälen in Richtung der Zelloberseite bei der Kultivierung von Neuronen auf festen Substraten ein Grund für die schwache Kopplung von Elektroden und Zellen [276].

Die meisten Untersuchungen mittels MEA-Chips in-vitro erfolgen in künstlichen zweidimensionalen Zellkulturen. Die erhaltenen Ergebnisse müssen vorsichtig interpretiert und u. a. mit in-vivo Experimenten bestätigt werden. Weitere Forschung zur verbesserten Simulation von in-vivo Bedingungen ist erforderlich [278]. Die Nutzung so genannter Zell-Sphäroide könnte in diesem Zusammenhang ein Ansatz sein [279]. Die Pflege der Zellkultur stellt bei Zell-basierten Biosensoren eine nicht zu unterschätzendes Problem dar, da ohne entsprechende Kontrolle der extrazellulären Umgebung die erzielten Ergebnisse u. U. nicht reproduzierbar sind. Obwohl Neuronen aufgrund ihrer elektrischen Signale und ihrer Empfindlichkeit gegenüber Neurotoxinen für Sensoranwendungen geeignet erscheinen, stellt die Zellkultur von Neuronen besonders in kritischen Umgebungen eine große Herausforderung dar [278]

Bei vergleichenden Untersuchungen unter Verwendung von Herzmuskelzellen sowie von MEA- und FET-basierten Sensoren konnte festgestellt werden, dass sich die ermittelten Signalformen nicht wesentlich unterscheiden. Es konnte allerdings gezeigt werden, dass die Eingangsimpedanz der verwendeten Verstärker einen großen Einfluss auf die Signalform hat. Zuverlässige Messungen können nur mit hohen Eingangsimpedanzen der Verstärkerelektronik erfolgen. Ein wesentlich besseres Modell zur Signalinterpretation ist für eine sinnvolle Bewertung der gemessenen Signalform notwendig [280].

3.3.2 Detektionsverfahren

Die Detektion von Aktionspotentialen mit Schwellen ist relativ einfach in Echtzeit implementierbar. Dieser Ansatz ist aber rauschanfällig und erfordert oft eine vorgegebene Schwellenhöhe. Überlappende *Spikes* können weitere Probleme bei dieser Detektion bereiten. *Template Matching* als eine zweite Detektionsmethode benötigt vorab den Verlauf der zu detektierenden *Spikes*. Deshalb muss der Anwender diese Kurvenverläufe oft für die *Template*-Bildung identifizieren. Schwelldetektion wie auch *Template Matching* haben Probleme, wenn das SNR klein ist. Besonders *Wavelet*-basierte Ansätze sind geeignet, wenn neben der Filterung und der Detektion auch eine Klassifizierung erfolgen soll. Bei alleiniger Detektion könnte dieser Ansatz aber zu aufwändig sein [281].

Energie-basierte Detektionsansätze können aufgrund ihrer Einfachheit schnell realisiert werden. Variationen dieses Ansatzes sind zudem in der Lage, den Detektionsfehler zu verkleinern sowie die Robustheit gegenüber dem Rauschen zu verbessern. Unter Beachtung einer Kostenfunktion, die die korrekte Detektion, die benötigte Datentransferrate und die Echtzeitfähigkeit berücksichtigt, wurden drei Detektionsansätze bewertet. Die gleichzeitige Anwendung einer positiven und negativen Schwelle, der Energiedetektor wie auch *Matched Filter* erzielten vergleichbare Resultate. Die Eignung bestimmter Schwellenhöhen wurde aber nicht untersucht. Die Daten dieser Studie deuten darauf hin, dass eine Verbesserung des SNR wichtiger als der Detektionsansatz selbst ist [281].

In einer weiteren Untersuchung verschiedener *Template*-, Energie-basierter und anderer Detektionsverfahren schnitt die einfache Schwelldetektion mittels Amplitude am schlechtesten ab. Die Summation und die Berechnung der kumulativen Energie eines Signalausschnittes erreichten die besten Ergebnisse im Test. Bemerkenswert ist bei den letzten beiden Verfahren, dass sie ohne *Templates* auskommen und somit für automatisierte Ansätze geeignet sind. Unter den *Template*-basierten Verfahren erzielte die Berechnung des Euklidischen Abstandes zwischen Signal und *Template* die beste Detektionsrate. Im Vergleich dazu weisen *Matched Filter* allerdings einen kleineren Detektionsfehler auf [282].

Das *Matched Filter*-Verfahren schneidet im Vergleich zu Amplituden- und Energie-basierter *Spike*-Detektion bei farbigem Rauschen besser ab. Zum Erreichen einer vergleichbaren Detektionsquote benötigten die beiden letzteren Ansätze einen deutlich besseren Signalrauschabstand. Im Falle von weißem Rauschen konnte nur der *Matched Filter*-Ansatz sein Detektionsergebnis verbessern [169]. Die Leistungsfähigkeit der Amplitudendetektion nimmt bei kleiner werdendem SNR stark ab. Die Detektion symmetrischer *Templates* mit einer Schwelle erzielt aufgrund der geringeren Redundanz leicht bessere Ergebnisse als der gemeinsame Einsatz einer positiven und einer negativen Schwelle. Das Setzen von *Trigger Boxes* kann nur manuell und damit zeitaufwändig erfolgen [164].

Die Auswertung der Signalenergie zur Detektion von Aktionspotentialen ist zwar der einfachen Amplitudendetektion überlegen. Bei einem kleinen SNR arbeiten die beiden letzten Verfahren aber ähnlich schlecht. Der alternative Einsatz eines Energieoperators wurde unter definierten SNR und realistischem Rauschen getestet. Der NEO (*Nonlinear Energy*

Operator)-Ansatz konnte dabei bestenfalls ein ähnliches Ergebnis wie konventionelle Methoden erzielen. Das *Matched Filter*-Verfahren zur Detektion von *Spikes* basiert letztlich auf *Template Matching* und ist deshalb für eine nicht überwachte Implementierung ungeeignet, da entsprechende *Templates* erstellt werden müssen. Ähnliches gilt für die klassische *Principal Components*-Methode. Eine Detektion mittels *Wavelet*-Transformation kann dagegen nicht überwacht implementiert werden [164].

Verwandte Detektionsmethoden bzw. kombinierte Detektions- und Klassifikationsansätze werden auch bei der *Spike*-Analyse in EEG-Daten angewendet. Aufgrund des Fehlens geeigneter Standarddaten ist auch hier die Bewertung und der Vergleich einzelner analytischer Methoden unklar, siehe Abschnitt 3.3.3. Bedingt durch Artefakte, Rauschen und niederfrequenten Driften ist eine Datenaufbereitung vor der Analyse sinnvoll. Das Fehlen einer exakter *Spike*-Definitionen führt auch bei der manuelle Analyse eines Datensatzes durch mehrere Experten zu deutlich unterschiedlichen Ergebnissen. Problematisch ist zudem die häufige Detektion vermeintlicher *Spikes*, auch *False Positives* [283]. Ähnliche Auswertemethoden kommen auch bei der Untersuchung von EMG (Elektromyograph)-Signalen zum Einsatz. Aufgrund des nicht stationären Signalcharakters, variabler Kurvenformen und verschiedener Rauschquellen treten bei dieser Signalanalyse vergleichbare Probleme auf [284].

3.3.3 Klassifikation

3.3.3.1 Notwendigkeit

Bei der messtechnischen Erfassung mehrerer Neuronen mit einer Sensorelektrode entstehen so genannte *Multiunit*-Signale. Die Sicherung des Informationsgehaltes dieser Signale kann durch die Separation bzw. die Klassifizierung der einzelnen neuronalen Reaktionen erfolgen, wozu allerdings entsprechende Algorithmen und Ressourcen erforderlich sind. Zum Nachweis der Notwendigkeit der Klassifikation wurden in einer Untersuchung zwei bis drei *Units* pro Sensorelektrode simuliert. Es zeigte sich, dass bei einer Kombination dieser Aktionspotentiale zu einem Signal, also bei einer unterlassenen Klassifikation, nicht zwangsläufig Information verloren geht. Entscheidend ist dabei, wie die betreffenden Neuronen reagieren [285].

Die Größe des Informationsgehaltes hängt von der Ähnlichkeit der Information der einzelnen *Unit*-Reaktionen ab. Unter Berücksichtigung eines realistischen Klassifikationsfehlers von 15 % enthält ein klassifizierter Datensatz mit zwei *Units* die gleiche Information wie der nicht separierte Datensatz, wenn eines der beiden Neurone unabhängig vom untersuchten Stimulus reagiert. Kleinere Klassifikationsfehler können zwar mit komplexen, überwachten Verfahren erreicht werden. Dagegen dürften die Fehler in einem vollständig, nicht überwachten Klassifikationsansatz größer sein. Sollten die neuronalen Reaktionen der *Units* allerdings zueinander korreliert sein, dann bleibt diese Information trotz der Zusammenfassung der einzelnen Stimulationsantworten erhalten [285, 286].

Weisen zwei *Units* einen ähnlichen Informationsgehalt auf und generieren ihre *Spikes* stimulusunabhängig, so besitzt das kombinierte *Spike*-Signal einen größeren Informationsgehalt als eine *Unit* allein [285]. Vergleichbare Resultate liefert auch [149]. Ob speziell bei der Anwendung von Neuroprothesen auf die Klassifikation verzichtet werden kann, hängt von zwei Faktoren ab. Einmal ist es entscheidend, wie benachbarte Neuronen einen Stimulus kodieren. Dies könnte redundant bzw. unabhängig von einander geschehen. Weiterhin ist zu beachten, wie der Klassifikationsfehler den Informationsgehalt des Messsignals beeinflusst. Allerdings muss bei dieser Anwendung nach wie vor ermittelt werden, ob der Informationsverlust aufgrund der Kombination der einzelnen neuronalen Reaktionen den Aufwand der *Spike*-Klassifikation rechtfertigt [285].

Besonders auf dem Gebiet der Neuroprothetik zeigt sich, dass die Aufzeichnung einer *Single-Unit*-Aktivität nur schwer zu erreichen ist. Entsprechende in-vivo Sensorelektroden müssen für erfolgreiche Aufzeichnungen in ihrer Geometrie an die zu untersuchenden Neuronen angepasst und in deren Nähe positioniert werden. Bewegungen dieser Elektroden im Gewebe können das Signalrauschverhältnis und die Form der aufgezeichneten Aktionspotentiale dramatisch ändern, was zu weiteren Herausforderungen hinsichtlich der Datenverarbeitung führen kann [287]. In diesem Zusammenhang kann gezeigt werden, dass sich entsprechende Prothesen mit klassifizierten als auch mit nicht klassifizierten *Units* gleichermaßen effektiv ansteuern lassen [288].

3.3.3.2 Ausgewählte Clusterverfahren

Eine Detektion und Clusterung bzw. Klassifikation mittels benutzerdefinierter Zeit-Spannungsfenster, so genannten *Trigger-Boxes*, und mit Hilfe wahrscheinlichkeitsbasierter EM-Clustermethoden liefern bei rauscharmen Signalen ähnliche Ergebnisse. Die Resultate von automatisierten EM-Methoden können bei einem größeren Rauschanteil des untersuchten Signals gegenüber der manuell aufwändig abgestimmten Fenstermethode deutlich besser ausfallen, da die *Trigger-Boxes* dann nur mit zunehmender Schwierigkeit platziert werden können [289]. Allerdings können statistische Verfahren, speziell EM-Ansätze, bei verschiedenen Startwerten bemerkenswert unterschiedliche Clusterergebnisse liefern. Eine geeignete Initialisierung des Clusterverfahrens ist daher besonders wichtig [209].

Mit synthetischen Daten wurden das *K-Means*- und ein EM-Verfahren bezüglich ihrer Klassifikationsfehler verglichen. Da die Bestimmung der tatsächlich vorhandenen *Cluster* ein großes Hindernis für viele Verfahren darstellt, wurde bei dieser Analyse nur mit zwei Klassen gearbeitet. Eine Klasse entsprach der markantesten *Unit*, während alle anderen *Units* in die zweite Klasse eingeordnet werden sollten. Die Clusterung erfolgte anhand der ersten beiden PCA-Komponenten. Im Durchschnitt konnte *K-Means* bessere Ergebnisse als das EM-Verfahren erzielen. Die Zuordnung zu lediglich zwei Klassen führte bei beiden Verfahren zu den größten Klassifikationsfehlern. Der EM-Ansatz war nur dann *K-Means* überlegen, wenn er mit der wirklichen *Unit*-Anzahl des Datensatzes initialisiert wurde. Dieses Vorgehen ist jedoch in der Praxis nicht realisierbar [290].

Unter Berücksichtigung von MEA-typischen Bedingungen wurden *Spike*-Daten synthetisiert, welche anschließend zum Vergleich der Verfahren *KlustaKwik*, sowie SPC (*Supraparamagnetic Clustering*) genutzt wurden. Diese Testdaten enthielten zwei *Units* sowie unkorreliertes bzw. korreliertes Rauschen mit bekannter Charakteristik. *KlustaKwik* dient der nicht überwachten Clusterung mehrdimensionaler Daten unter der Annahme einer Gaußschen Mischverteilung. SPC stellt einen nicht überwachten, statistischen Clusteransatz dar, der ohne Annahmen der vorliegenden Verteilungen auskommt. Es wurden die ersten drei Hauptkomponenten der PCA bzw. zehn *Wavelet*-Koeffizienten von extrahierten Aktionspotentialen zur Clusterung genutzt [277].

KlustaKwik konnte nur für fünf der zehn *Wavelet*-Koeffizienten die Daten in zwei Clustern trennen. Für die Clusterung der PCA-Daten musste die Höchstzahl der Cluster auf fünf beschränkt werden, da *KlustaKwik* sonst die korrekte Clusterzahl nicht selbstständig finden konnte. Der SPC-Ansatz konnte lediglich für die *Wavelet*-Daten genau zwei Cluster identifizieren. Meist wurden von beiden Verfahren mehr als zwei Cluster gefunden. Bei gutem SNR lieferte die Clusterung der PCA-Daten bessere Ergebnisse. Dabei arbeiteten *KlustaKwik* und SPC auf ähnlichem Niveau. Bei kleinerem SNR lieferte die Clusterung der PCA- und *Wavelet*-Daten vergleichbare Resultate. SPC tendiert dann dazu, *Spikes* nicht zu klassifizieren. Dagegen tritt bei *KlustaKwik* eine Tendenz zur falschen Klassifizierung der Daten auf. Bei sehr ähnlichen *Units* liefert die Clusterung der *Wavelet*-Koeffizienten im Vergleich zu den PCA-Daten deutlich bessere Ergebnisse [277].

3.3.3.3 Klassifikationsverfahren

Der Klassifikationserfolg hängt von der Einhaltung der getroffenen Annahmen ab. Es ist z. T. schwierig, eine Aussage über die Gültigkeit dieser Annahmen zu machen. Viele Verfahren gehen von einer zeitlich konstanten Form der Aktionspotentiale aus. In einem *Burst* entstehen aber *Spikes* mit variablen Formen und einer Amplitudenänderung um bis zu 80 %, die einen wesentlichen Grund für Klassifikationsfehler darstellen. Die Cluster einer *Unit* können so „verschmieren“ oder sich „verlängern“. Mit einer multivariaten Gauß-Clusterung kann man das Problem lösen, wenn die Variationen nicht zu stark sind und die einzelnen *Spikes* sicher detektiert werden können. Feuern aber mehrere Neuronen einer Region gleichzeitig in *Bursts*, dann versagt auch diese Alternative [152, 291].

Die Konstanz des Hintergrundrauschens stellt eine weitere, häufige Annahme dar. Ändert sich das Rauschen während des Experimentes nicht, liefert eine Klassifikationsmethode gleich bleibende Ergebnisse. Bei einer Änderung bzw. Erhöhung des Rauschpegels wird es dagegen vermehrt zu Fehlklassifikationen kommen. Aufgrund der Komplexität eines zeitlich veränderlichen Rauschmodells wird meist von einem unveränderlichen Rauschverhalten ausgegangen. Die Ausrichtung der erfassten Aktionspotentiale kann für die Genauigkeit der Klassifikation ebenfalls wichtig sein. Meist werden die *Spikes* bezüglich ihres Maximums ausgerichtet. Bei einer ungünstigen Abtastung der Kurvenformen führt dieser Ansatz aber nicht immer zur akkuraten Ausrichtung [152].

Für einige Anwendungen kann die Auflösung von sich überlappenden Aktionspotentialen zur Verringerung von Klassifikationsfehlern sinnvoll sein. Aufgrund unterschiedlicher Überlappungsgrade und Kombinationsmöglichkeiten können diese Verfahren jedoch rechenintensiv sein. Speziell in in-vivo Experimenten kann es zudem während der Messung zu einer Veränderung der Elektrodenposition im neuronalen Gewebe kommen, die dann zu einer sukzessiven Formveränderung der detektierten Aktionspotentiale führt. Verfahren zur Behandlung der Amplitudenvariationen in *Bursts* können auch auf dieses Problem angewendet werden, indem für einen bestimmten Zeitabschnitt Merkmale extrahiert bzw. *Templates* gebildet und diese dann langsam nachgeführt werden [152].

Die *Spike*-Amplitude wurde früh als einfachstes Klassifikationsmerkmal genutzt. Gemeinsam mit der Ausbreitungsgeschwindigkeit eines *Spike* kann sie in rauschfreien Messungen wirksam zur *Unit*-Separation genutzt werden. Die *Spike*-Breite, die Zeit bis zum Nulldurchgang oder die Zeitdauer zwischen Maximum und Minimum eigneten sich weniger für die Klassifikation. *Template Matching* kann bei gutem SNR anderen Verfahren überlegen sein. Bei erhöhtem Rauschen und in *Burst*-Analysen sind Hauptkomponentenmethoden vorteilhafter. Stehen bei einer Messung nicht genügend Sensorelektroden zur Verfügung, ist *Optimal Filtering* weniger erfolgreich. Klassifikationen anhand nur eines Merkmal eignen sich nur für relativ rauscharme Messungen, minimal zwei bis drei Merkmale sollten bei der Verwendung von linearen Filtern genutzt werden [292].

Bei einem ausreichend großen Unterschied in der Amplitude der Aktionspotentiale kann ein einfacher Schwellendetektor zum Erkennen und Klassifizieren der Kurvenformen eingesetzt werden. Diese einfachen und auch zuerst eingesetzten Methoden zur Unterscheidung von *Spikes* bezüglich ihrer Höhe und Breite sind aufgrund des Hintergrundrauschens und möglicher *Spike*-Überlagerungen relativ ungenau. Der Experimentator muss zudem Randbedingungen definieren, die eine Entstehung von Clustern basierend auf der Schwelldetektion ermöglichen. Diese Methode kann bei stabilen Clustern *online* angewendet werden. Andernfalls kommt dieses Verfahren nur für die *offline* Analyse in Betracht [293].

Die Klassifizierung mittels Fourier-Koeffizienten ist nur wenig besser als die alleinige Auswertung von Maximum und Minimum eines *Spikes*. Die PCA lieferte bei einer Untersuchung die besten Ergebnisse [151]. In einer weiteren Analyse erfolgte die gemeinsame Bewertung von Detektion, Ausrichtung und Klassifikation. Nach erfolgter Schwelldetektion werden verschiedene *Template Matching*-Ansätze zur Ausrichtung und Klassifikation der Aktionspotentiale verwendet. Unter Berücksichtigung der Komplexität der Algorithmen und der ermittelten Klassifikationsfehler schnitt die Auswertung der Flächen der einzelnen *Spike*-Phasen gegenüber der PCA-Klassifikation und der Klassifikation mittels Amplitudenwerten am besten ab. Allerdings wurde nicht erläutert, wie die einzelnen Klassifikationsparameter konkret ermittelt wurden [181].

Das *Template Matching* anhand aller Abtastwerte und der *Spike*-Fläche kann der Amplitudenauswertung bzw. der Klassifizierung mittels Zeit-Spannungsfenstern überlegen sein [234]. Die Auswertung der Varianz einzelner Abtastwerte ist der Klassifikation mittels *Trigger-Boxes* überlegen. Im Vergleich zu PCA-Verfahren erzielt dieser Ansatz bei geringerer

Komplexität vergleichbare Resultate [204, 294]. Eine Analyse von *Template*-Verfahren, der Clusterung nach Bayes sowie des Programms *Brainwaves* zeigt, dass bei gut separierbaren Clustern ähnliche Ergebnisse erzielt werden. Der Bayes-Ansatz ist dagegen deutlich genauer, wenn ähnliche *Spike*-Formen existieren. Das Bayes-Verfahren liefert auch in *Bursts* und bei Elektrodendrift gegenüber *Template*-basierten Methoden bessere Ergebnisse und kann zur Auflösung von *Spikes*-Überlagerung genutzt werden [206, 210].

Es ist vorteilhaft, die Zahl der erwarteten *Units* höher als erwartet anzusetzen. Es sind dann aber Verfahren erforderlich, die die entstandenen komplexeren Cluster zusammenfassen oder aufteilen. Alternativ können in einem Bayes-Ansatz die Wahrscheinlichkeiten einer bestimmten Clusterzahl und Klassenzuordnung gegeben sein. Zusätzliche Informationen wie das Inter-*Spike* Interval und Aktivitätsstatistiken können in das Clustermodell eingebracht werden. Der Bayes-Ansatz ist jedoch relativ rechenintensiv und könnte deshalb nur für eine *offline* Analyse von Signalen kurzer Dauer geeignet sein. Auch die Verwendung optimaler Filter in Kombination mit Mehrfachelektroden kann einen größeren Rechenaufwand verursachen. Es ist bei längeren Experimenten aber wünschenswert, eine Filterung und Detektion in Echtzeit durchzuführen [295, 296]

Der Einsatz von Mehrfachelektroden gilt als viel versprechend. In Kombination mit einfachen Clustermethoden kann die Anzahl identifizierbarer *Units* erhöht werden. Eine Messung mit Einfachelektroden und Schwellendetektion ist zwar relativ einfach und schnell umsetzbar. Die Suche nach gut isolierbaren Neuronen kann aber zeitaufwändig sein. Zudem kann dann die Klassifikation durch *Spikes* mit großen Amplituden, die aber nicht notwendigerweise für das gesamte neuronale Netz repräsentativ sind, beeinflusst werden. Die *offline* Datenanalyse mit verschiedenen Programmen kann u. a. durch die Automatisierung einiger Aspekte die Klassifikationsergebnisse verbessern. Die Klassifikation von sich überlappenden Aktionspotentialen in *Bursts* stellt ein großes Problem dar [152].

Bei *Spikes* ohne Überlappungen können ein künstliches neuronales Netz und das *Template Matching*-Verfahren vergleichbare Klassifikationsresultate erreichen. Bei Überlagerung erzielt ein KNN deutlich bessere Ergebnisse, da *Template Matching* die Überlappungen nicht auflösen kann. Das Klassifikationsergebnis des KNN ist vom Grad der Überlagerung abhängig. Beide Klassifikationsansätze zeigen Probleme, wenn sich die Amplitude der Aktionspotentiale z. B. in *Bursts* ändert. KNN reagieren relativ unempfindlich auf die *Spike*-Ausrichtung [154, 197]. Ähnliche Aussagen konnten bei einem weiteren Vergleich von KNN, *Template Matching* und *K-Means*-Verfahren getroffen werden [297]. Es entsteht bei KNN aber ein relativ großer Trainingsaufwand [197]. Die Klassifikation mittels KNN ist bei einem geeigneten Trainingssatz robuster gegenüber Amplitudenvariationen von *Spikes* und kann dann *Template Matching* und PCA überlegen sein [229].

Eine Auswertung der *Wavelet*-basierten Klassifizierung anhand künstlicher Daten und manueller Clusterung zeigte, dass diese Methode der klassischen PCA bzw. dem Ansatz mit einem reduziertem Satz an Merkmalen überlegen ist [194]. Vergleichbare Ergebnisse können mit der DWT und automatisierten Clusterverfahren erzielt werden [163]. Unter Verwendung realer in-vitro Daten kann gezeigt werden, dass der *Wavelet Packet*-Ansatz spe-

ziell bei *Units* kleinerer Amplitude bessere Klassifikationsergebnisse als die PCA erreichen kann [160, 161]. Aufgrund der Verschiebungsvarianz der DWT kann es bei einer *online* Clusterung von neuronalen Daten mittels *Wavelet*-Koeffizienten zu Problemen aufgrund der möglichen Phasenverschiebung des detektierten Zeitsignals kommen [298].

Eine auf der *Wavelet*-Transformation basierende Klassifikation ist nur dann der PCA überlegen, wenn das *Wavelet* und die Koeffizienten für die Klassifikation passend gewählt werden. Sonst sind die Klassifikationsergebnisse der *Wavelet*-Transformation bestenfalls mit denen der PCA vergleichbar. Die ersten zwei bis drei Hauptkomponenten der PCA sind zur Darstellung der Varianz der Kurvenform optimal geeignet. Sie sind aber zur Repräsentation kleinerer Unterschiede zwischen einzelnen *Units* ungeeignet. In diesem Fall kann es gegenüber der *Wavelet*-basierten Klassifikation zu vermehrten Fehlern kommen. Aufgrund der Multi-Skalensignalanalyse der *Wavelet*-Transformation können diese kleineren Merkmalsunterschiede bei geeigneter Parameterwahl besser ausgewertet werden. Besonders in Messungen mit vielen aktiven Neuronen, die deutlich unterscheidbare wie auch relativ ähnliche *Spikes* generieren, kann der *Wavelet*-Ansatz trotzdem zu problematischen Klassifikationsergebnissen führen [299].

Daher kann eine Kombination beider Verfahren die Fehler der Klassifikation reduzieren. Die PCA dient zunächst der Dimensionsreduzierung. Nach der Clusterung der Hauptkomponenten entsprechen die jeweiligen Schwerpunkte der Cluster den gemittelten Verläufen potentieller *Spikes*. Danach kann die Wahl eines *Wavelets* erfolgen, welches Ähnlichkeiten mit den vorläufig bestimmten Kurvenformen besitzt. Anschließend können diese Kurvenformen mit der *Wavelet*-Transformation analysiert werden. Als nächstes erfolgt die Auswahl der *Wavelet*-Koeffizienten, die sich bei den repräsentativen Kurvenformen maximal unterscheiden. Basierend auf diesen Ergebnissen können endlich die einzelnen *Spikes* des Datensatzes klassifiziert werden. Mit dieser Methode kann eine bessere Clusterseparation erzielt werden. Es werden so diejenigen Klassifikationsfehler reduziert, die durch sich überlappende Clusterbereiche entstehen [299].

Das Vorhandensein von statistischen Unterschieden zwischen *Spikes* verschiedener Neuronen ist eine Grundvoraussetzung für eine erfolgreiche Klassifikation dieser Signale. Der Unterschied kann die Amplitude und oder die Form der aufgezeichneten *Spikes* betreffen. Wird trotz des Fehlens dieses statistischen Unterschiedes z. B. aufgrund einer unerwartet hohen *Spike*-Frequenz das Vorhandensein mehrerer *Units* vermutet, so kann lediglich mit einer Änderung der Elektrodenposition bezüglich der untersuchten Neuronen eine bessere Klassifikation ermöglicht werden [293].

Die Anzahl der detektierten Aktionspotentiale beeinflusst die ermittelte *Spikes*-Form selbst. D. h. in der Praxis muss eine ausreichende Anzahl von *Spikes* vorliegen, um eine robuste Abschätzung der Kurvenform vornehmen zu können. Speziell bei einer *online* Analyse können Ansätze wie *Noisy Interpolation* oder Glättung nützlich sein, da damit eine genauere Abschätzung der Kurvenform mit deutlich weniger Daten erfolgen kann [152]. Auch die gewählte Abtastrate kann einen Einfluss auf die Streuung der Merkmalscluster haben. Mittels Interpolation von Abtastwerten kann die Erfassung von *Spike*-Merkmalen, die Ausrichtung

der extrahierten *Spikes* und die Kompaktheit der ermittelten Cluster verbessert werden. Allerdings muss ein Kompromiss bezüglich der *Hardware* für die Datenakquise und der Berechnungszeit getroffen werden [300–302].

Im Verlauf einer *online* Klassifikation kann nur auf die bereits vorhandene Information der einzelnen Klassen zurückgegriffen werden. Während eines Experimentes können sich *Spike*-Formen aber ändern und neue Klassen bzw. *Units* auftreten, die während einer Lernphase noch nicht präsent waren. Eine iterative Aktualisierung und Ergänzung des Klassifikationsmodells während der Messung könnte hier Abhilfe leisten. Gleichzeitig können so zuvor getrennte Cluster aber verschmelzen. Besonders bei stärkerem Rauschen ist es möglich, dass nicht jeder der so gefundenen Cluster einer *Unit* entspricht. Die Analyse von *Bursts* erschwert die Klassifikation weiter. Daher kann eine zusätzliche statistische Auswertung mit möglicher Auftrennung, Verschmelzung bzw. Auflösung der Cluster und eine visuelle Überprüfung, auch im Anschluss an die Messung, notwendig sein [182].

Eine alternative Vorgehensweise bei der Echtzeitklassifikation wird in [240] vorgeschlagen. Das vorgestellte *Template Matching*-Verfahren wertet den im Vergleich zu möglichen Amplitudenänderungen relativ konstanten zeitlichen Abstand zwischen dem Maximum und dem Minimum eines Aktionspotentials, den Effektivwert der Amplitude sowie das Maximum und das Minimum aus. Es werden auch hier die erste detektierte Kurvenform als erstes *Template* verwendet und im Bedarfsfall weitere Klassen geschaffen. Jedoch werden diese *Templates* zur Vermeidung einer Clustermigration nicht nachgeführt bzw. gemittelt. Es erfolgt aber ein zweiter Test der gemittelten Aktionspotentiale einer Klasse, um die Klassifikation des aktuell untersuchten *Spike* abzuschließen. Bei der Anwendung des *Template Matching* zur Echtzeitanalyse könnte eine Bibliothek von bei vorherigen Experimenten ermittelten *Spike Templates* zusätzlich genutzt werden [303].

Die Genauigkeit der *Unit*-Separation beeinflusst die nachfolgende Analyse ganzer *Spike Trains*, also einer Folge von Aktionspotentialen. Zahlreiche Verfahren für die Sortierung von *Spikes* werden derzeit angewendet. Jedoch besteht kein Konsens bezüglich des besten Ansatzes. Die Anwendung unterschiedlicher Verfahren der Klassifikation auf einen Datensatz führt auch zu unterschiedlichen Klassifikationsergebnissen. Oftmals liegen instabile Cluster, Schwierigkeiten bei der Bestimmung der tatsächlichen Neuronenanzahl sowie eine teilweise Überlappung der Wahrscheinlichkeitsverteilung der einzelnen *Spike*-Klassen vor, welche die Klassifizierung erschweren. Zudem erfordern unterschiedliche Anordnungen und Geometrien von Elektroden meist unterschiedliche Sortieralgorithmen [304].

3.3.3.4 Fazit

Trotz einer großen Bandbreite an Cluster- und Klassifikationsansätzen lassen sich keine universell überlegenen Methoden identifizieren. Allenfalls besteht ein Effizienzunterschied der einzelnen Verfahren. Die Auswahl eines Algorithmus beruht vielmehr auf dem Klassifikationsziel, dem vorhandenen Hintergrundwissen der Messung und den konkreten Bedingungen des Experimentes [305]. Zudem eignen sich Klassifikationsmethoden für verschiedene Datensätze unterschiedlich gut. So gibt es z. B. keine universell gültige Auswahl von am Besten für die Klassifizierung geeigneten *Wavelet*-Koeffizienten. Es lassen sich immer Gegenbeispiele finden, in denen andere Koeffizienten zu besseren Ergebnissen führen werden. Im Vergleich zur PCA muss die Klassifikation mittels DWT somit nicht zwangsläufig besser ausfallen [299]. Die PCA kann zur Kompression genutzt werden. Allerdings kann die Clusteranalyse der Hauptkomponenten bei zu vielen isotropisch verteilten Clustern oder bei Vorhandensein von Ausreißern problematisch sein [306].

Das Fehlen objektiver Maßstäbe erschwert generell die Beurteilung von Klassifikationsmethoden verschiedener Forschergruppen und die Interpretation der erzielten Ergebnisse [291]. Die Art der genutzten Testdaten kann bei der Begutachtung wichtig sein. Künstliche Datensätze besitzen zwar eine bekannte Zahl von *Units*. Allerdings kann u. U. mit diesen Daten nur eine eingeschränkte Annäherung an tatsächlichen Messbedingungen möglich sein [307]. Bei der Verwendung von realen Daten kann der Ergebnisvergleich aufgrund der unbekannt, wirklichen Anzahl von Signalklassen im Datensatz problematisch sein. Die oft angewendete manuelle Sortierung selbst durch erfahrene Anwender kann bedingt durch die Subjektivität zu deutlich unterschiedlichen Ergebnissen führen [34]. Zur objektiveren Bewertung von Klassifikationsansätzen kann eine gleichzeitige intra- und extrazelluläre Messung von Aktionspotentialen sinnvoll sein [170, 308]. Dieser Ansatz dürfte aber nur für eine relativ kleine Neuronenzahl praktikabel sein.

Ein systematischer Vergleich von Verfahren der *Unit*-Separation unter Berücksichtigung der größer werdenden Elektrodenzahl, der unterschiedlichen Elektrodenkonfigurationen, der vorhandenen Messbedingungen sowie gegebenenfalls unter Beachtung bestimmter Hirnregionen ist erforderlich [304]. Speziell bei MEA-Anwendungen ist aufgrund des geringen Signalrauschabstandes der Messungen das Vorhandensein von definierten und zugleich realistischen Testdaten zur Bewertung von Detektions- und Klassifikationsverfahren erforderlich. Eine Reihe von Methoden zur Datengenerierung basiert auf bereits vorhandenen neuronalen Messungen, welche Aktionspotentiale enthalten. Diese *Spikes* können neu kombiniert und mit Rauschen versehen bzw. zur Synthese von vergleichbaren Daten genutzt werden. Alternativ werden Simulationsprogramme, wie z. B. GENESIS (*General Neural Simulation System*), zur Datengeneration genutzt. Es existieren auch aktuelle Ansätze zur Synthese von realistischen *Spike*-Daten ohne bekannte Struktur des neuronalen Netzes. Ein Ersatzschaltbild kann dann den Einfluss der Zellgeometrie des Neurons und den Abstand zur MEA-Elektrode simulieren [277, 309].

4 Aufgabenstellung

Die Ausführungen in Kapitel 2 und 3 lassen zwei große Aufgabenkomplexe erkennen. Zum einen soll die Verifizierung eines multiparametrischen Neurosensors auf Siliziumbasis erfolgen. Dazu müssen verschiedene externe Schaltungsmodule für diesen neuartigen Sensor entworfen und evaluiert werden. Basierend auf mehreren Arbeiten [5, 310, 311] sollen neben klassischen Schaltungskomponenten wie Spannungsversorgung, Temperaturkontrolle und externer Signalkonditionierung zusätzliche Komponenten zum Auslesen und zur Konfiguration des Sensorchips entwickelt werden. Die dabei gewonnenen Erkenntnisse werden in eine Weiterentwicklung vergleichbarer Sensorsysteme einfließen.

Neben den Eigenschaften des Sensorchips sind die Signalaufbereitung mittels mehrkanaliger, analoger Schaltungstechnik und die anschließende Digitalisierung von zentraler Bedeutung für die nachfolgende Signalauswertung. Die Bandbreite und das Rauschverhalten der Signalkonditionierung bzw. das Rauschen des gesamten Messsystems haben einen großen Einfluss auf das erzielbare Signalrauschverhältnis, da die Amplituden der Aktionspotentiale und das Sensorrauschen sich u. U. in einer ähnlichen Größenordnung befinden können. Eine Untersuchung des Neuro-Sensors zusammen mit der entworfenen Testumgebung stellt somit eine wesentliche Grundlage für die Signalanalyse dar.

Der zweite wichtige Aufgabenkomplex umfasst die automatisierte Datenakquise, die *online* Detektion und die Archivierung der erfassten Sensordaten. Die gewünschte Erhöhung der Sensoranzahl eines MEA-Chips steht im Widerspruch zum immer noch notwendigen, relativ hohen manuellen Anteil der Datenanalyse. Eine Automatisierung dieser Analyse könnte die Vorbereitung und Durchführung der MEA-Experimente vereinfachen. Aufgrund zahlreicher Veröffentlichungen zum Thema und den darin geschilderten Problemen, siehe auch Abschnitte 3.2.1, 3.2.2 sowie 3.2.3, ist die Entwicklung eines allgemein einsetzbaren, vollautomatischen Verfahrens zur Signalauswertung und Klassifizierung von Aktionspotentialen im Rahmen dieser Arbeit nicht zu erwarten.

Jedoch kann z. B. eine Teilautomation die bisherige Verfahrensweise bei MEA-Experimenten reproduzierbar und zuverlässig vereinfachen. Mit Verfahren der Mustererkennung können *Templates* für die Signalklassifizierung identifiziert werden. Die Literatur legt allerdings nahe, dass die zunächst unbekanntes *Spike*-Formen der einzelnen *Units* ggf. eine manuelle Bewertung der ermittelten *Templates* erfordern. Die hier untersuchten Verfahren zur Clusterung und Klassifizierung von Aktionspotentialen und ihre Bewertung können aber Impulse für weitere Untersuchungen liefern. Zusätzlich soll ein *Interface* die Konfiguration des Messsystems und eine verlustfreie Datenerfassung ermöglichen. Die Messdaten sollen in einem zu anderen Systemen kompatiblen Datenformat abgelegt werden.

5 Elektronik-Konzept

Prinzipiell kann die bei der Datenakquise neuronaler Aktivität benötigte Messanordnung in vier unterschiedliche Bereiche unterteilt werden, siehe Abbildung 5.1. Dies sind die Bereiche der Elektroden, der analogen Signalverarbeitung, der digitalen Signalvorverarbeitung sowie der Bereich der Computersteuerung. Die meist in Arrays angeordneten Elektroden ermöglichen die Erfassung der durch Ionenströme in den neuronalen Zellen entstandenen Aktionspotentiale. Diese analogen Rohsignale werden vor der Digitalisierung konditioniert, d. h. sie werden verstärkt und gefiltert. Nach der Digitalisierung können die Messsignale auf einem PC (Personalcomputer) gespeichert und visualisiert werden [2].

In einem Ersatzschaltbild lassen sich die frequenzabhängigen Elektrodeneigenschaften darstellen. Die Impedanz der Elektrode beeinflusst die Bandbreite und den thermischen Rauschanteil des Messsignals. Dabei ist zu beachten, dass die Signalenergie eines Aktionspotentials sich hauptsächlich im Frequenzbereich von 0,2 kHz bis 5 kHz befindet. Zudem beeinflusst die Elektrodengröße die Anzahl der gleichzeitig erfassbaren Neuronen. Die Größe der Elektrode hat auch Einfluss auf die messbare Amplitude der Aktionspotentiale, da diese aufgrund eines möglichen Nebenschlusses zwischen der Elektrode und dem extrazellulären Medium reduziert werden kann. In der analogen Signalverarbeitung erfolgen die Impedanzwandlung sowie die Verstärkung des Messsignals für die nachfolgenden AD-Wandlung. Weiterhin wird hier eine Filterung des Signals durchgeführt, um das Rauschen und eventuelle Störungen zu minimieren und um das Nyquist-Kriterium einzuhalten [2].

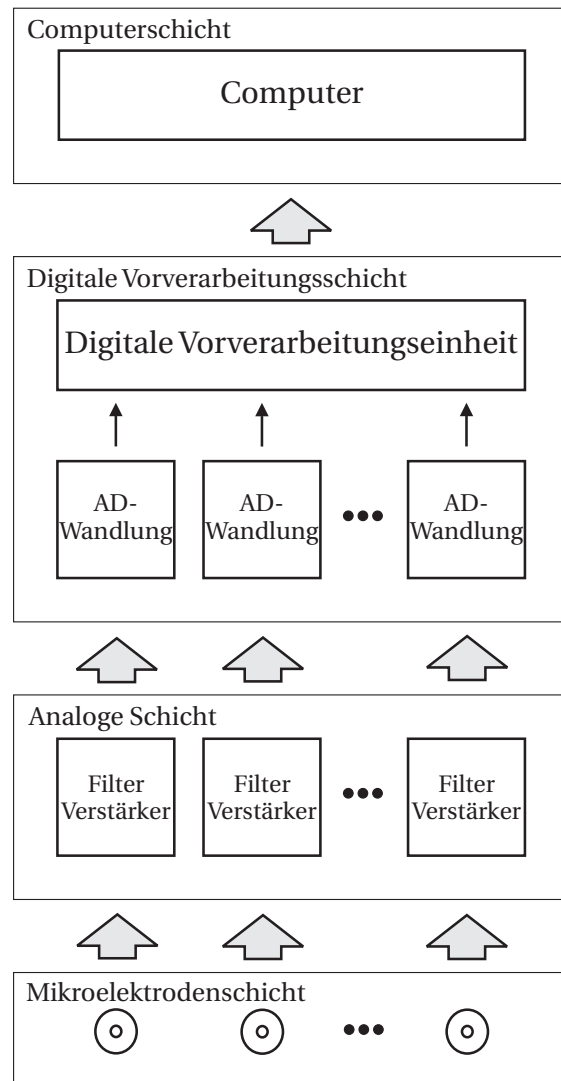


Abbildung 5.1: Prinzip der Datenakquise bei MEA-Messungen nach [2]

Die Messung der neuronalen Aktivität erfolgt bezüglich einer Referenz nahe des Elektrodenarrays. Nach der Digitalisierung kann zusätzlich gefiltert werden. Neben einer kontinuierlichen Datenerfassung mit nachfolgender *offline* Detektion kann die Signalvorverarbeitung bei entsprechenden Ressourcen auch zur *online* Signaldetektion genutzt werden. Dabei kann eine parallelisierte Vorverarbeitung mittels DSP-Modulen die Verarbeitungszeit reduzieren und die Anzahl der nutzbaren Elektroden erhöhen. Auf dem Computer werden schließlich die Datenverwaltung, die Visualisierung, die Signalauswertung und das Benutzer-Interface realisiert. Bei einer neuronalen Datenerfassung kann die Vorbereitung eines Experimentes schwierig und zeitaufwändig sein, da für jede Sensorelektrode die *Spike*-Detektion manuell angepasst werden muss. Bei steigender Anzahl untersuchter Neuronen verschärft sich diese Situation [2].

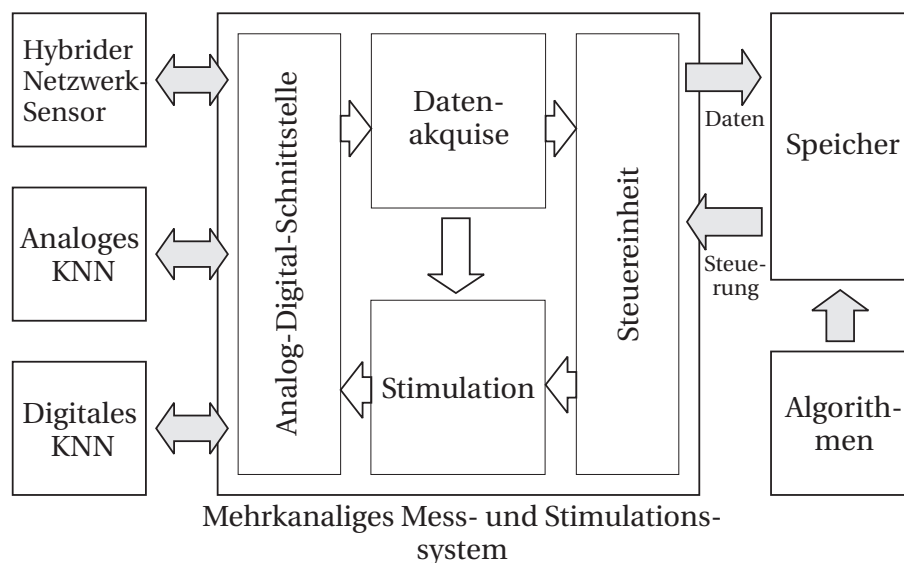


Abbildung 5.2: Aufbau eines Systems unter Verwendung eines Hybridsensors nach [3]

Ein vergleichbarer Systemaufbau zur neuronalen Signalanalyse kann bei der Verwendung hybrider Netzwerksensoren in in-vitro Untersuchungen zur Anwendung kommen. Erkenntnisse der Mikrosystemtechnik lassen sich im Bezug auf die Sensorentwicklung einbringen. Neuronen und Gliazellen werden zunächst auf einem Siliziumsubstrat kultiviert. Unter Nutzung von im Siliziumsubstrat eingebetteten Sensoren kann dann das Verhalten des biologischen Netzwerkes aufgezeichnet werden. Eine Stimulation bzw. elektrische Reizung des neuronalen Netzes ist ebenso möglich. Die prinzipielle Darstellung eines möglichen Systemaufbaus ist in Abbildung 5.2 zu sehen [3]. Neben der Aufbereitung und Analyse der neuronalen Signale kann z. B. auch ein Datenaustausch mit künstlichen analogen bzw. digitalen neuronalen Netzen [3, 312] oder wie in [49, 233, 313, 314] eine Ansteuerung eines Roboters mit geschlossener Signalkette erfolgen. Neben klassischen Anwendungen wie Substanztests lassen sich so auch neue Aufgabengebiete erschließen.

5.1 Neuro-Sensor BISC 02

Im Zentrum der Untersuchungen steht der in Abbildung 5.3 dargestellte Neurosensor BISC 0202 der Firma Micronas GmbH (Freiburg, Breisgau). Dieser Sensor auf CMOS-Basis besitzt 68 Palladium-Elektroden für elektrophysiologische Messungen, zwei IS-FET-Sensoren für die Ermittlung der Änderungsrate der Ansäuerung des Mediums durch Zellen sowie 14 CPFET-Sensoren zur alternativen Erfassung der neuronalen Zellaktivität. Das neuronale Netzwerk wird direkt auf der Oberfläche des Siliziumsensors innerhalb eines Verkapselungsteils bzw. Trogs kultiviert. Der Sensor weist im Gegensatz zu Vorgängermodellen eine zusätzlich integrierte Signalkonditionierung auf, welche die externe Sensorbeschaltung reduziert. 64 der 68 Sensorelektroden, die in einem 8 x 8 Array angeordnet sind, können diese Elektronik nutzen. Die Konditionierung umfasst eine Verstärkung sowie eine Tiefpassfilterung des Messsignals. Nach dem Passieren einer Multiplexerstufe und des sich anschließenden *Pad*-Treibers steht das Signal an einem Ausgangspin des Chips zur Verfügung. Die verbleibenden vier Elektroden können für Vergleichsmessungen genutzt werden. Sie sind jeweils direkt, also ohne kapazitive Kopplung, an einem *Pin* des Chips abgreifbar [315].

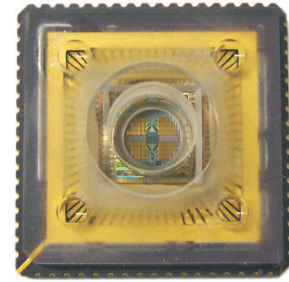


Abbildung 5.3: BISC 02

5.1.1 Prinzipieller Aufbau

Der Signalfluss für die 64 MEA-Signale ist in der Abbildung 5.4 detaillierter dargestellt. Ein Signal dieses Arrays erreicht zuerst eine Schaltergruppe, welche die Elektrodenkonfiguration beeinflussen kann. Der nachfolgende, nicht invertierende Verstärker kann das Messsignal nominell bis auf das Tausendfache verstärken, siehe besonders hierzu auch Abschnitt 5.1.3.2. Der sich anschließende Butterworth-Tiefpass zweiter Ordnung besitzt eine Grenzfrequenz von ca. 6 kHz. Dieser Tiefpass dient der Bandbegrenzung und der *Anti-Aliasing*-Filterung. Zusammen mit einer optionalen, kapazitiven Elektrodenkopplung gestattet das Filter auch eine Bandpassfilterung des Sensorsignals. Das Messsignal erreicht dann einen Multiplexer, der jeweils aus einer Gruppe von acht Elektroden ein Signal nach außen führt. Es sind acht MUX auf dem Chip vorhanden. Aufgrund des R_{on} des analogen Multiplexers sowie der *Pad*-Kapazität ist eine Pufferung des Sensorsignals vor der Signalausgabe notwendig. Diese Aufgabe übernimmt der folgende invertierende *Pad*-Treiber ($v = -1$). Die große Verstärkung des Eingangsverstärkers am Anfang des Signalweges ermöglicht eine günstige Beeinflussung der Rausch-, Drift- und *Offset*-Größen.

Alle aktiven Komponenten des Sensorchips verfügen über eine *Offset*-Kompensation sowie über einen Zugang zu dem analogen Testbus des Chips. Dieser Bus ermöglicht die Testung der einzelnen Verstärker, Filter bzw. *Pad*-Treiber. Die Chipkonfiguration erfolgt

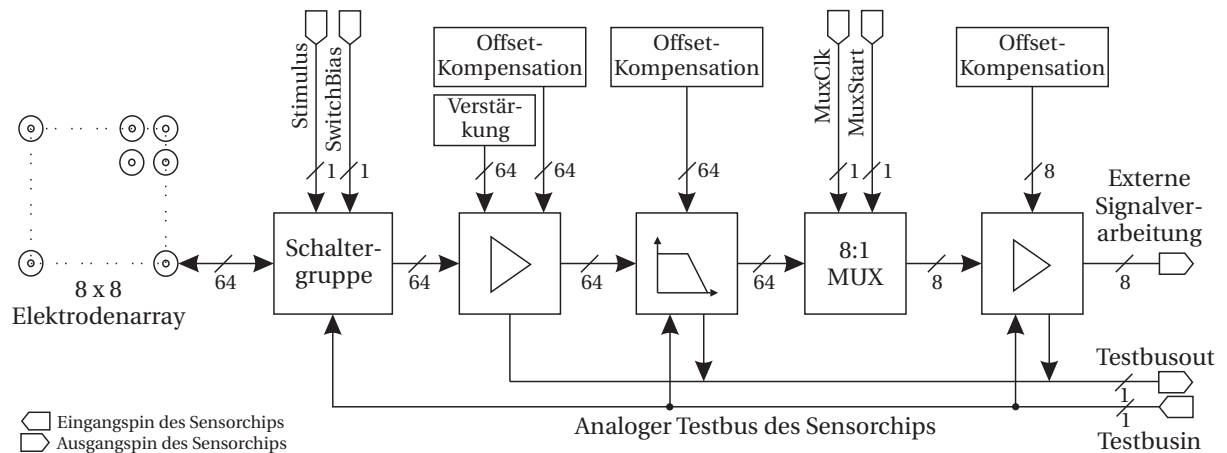


Abbildung 5.4: Prinzipdarstellung des BISC 0201 bzw. 0202

mittels I²C (*Inter Integrated Circuit*)-Bus. Die I²C-Register des Chips können in vier Gruppen unterteilt werden. Ein Registertyp übernimmt die Konfiguration der Eingangsschaltergruppe sowie des Eingangsverstärkers. Eine zweite Gruppe kontrolliert die Filteroptionen. Schließlich existieren noch Register für die MUX-Steuerung sowie für die *Bias*-Konfiguration des Chips. Gleichzeitig können acht verschiedene, aufbereitete Signale des Multi-elektrodenarrays durch Zeitmultiplexbetrieb an acht Ausgangspins abgegriffen werden. Die Dimensionierung der *Pad*-Treiber ermöglicht eine ausreichend hohe Abtastung der MEA-Elektrodensignale. Zusätzlich können die verbleibenden vier Elektroden für Vergleichsmessungen direkt abgegriffen werden. Zur Ansteuerung der auf dem Chip befindlichen ISFET- und CPFET-Sensoren ist externe *Hardware* erforderlich.

Eine auf dem Sensor integrierte *Bandgap*-Stufe stellt für alle aktiven Komponenten des Chips das analoge Bezugspotential AGND (*Analog Ground*) von ca. +3,8 V zur Verfügung und ermöglicht trotz unipolarer Betriebsspannung eine Verarbeitung der bipolaren Messsignale. Zudem wird die *Bandgap*-Stufe für die *Bias*-Stromgenerierung benötigt. Diese Ströme sind für die Einstellung der Arbeitspunkte sowie für die Konfiguration der *Offset*-Kompensation der Verstärker, Filter und *Pad*-Treiber erforderlich. Über die Arbeitspunkte lassen sich nicht nur Kennlinienverläufe sondern auch die Stromaufnahme des Sensors beeinflussen. Zusätzlich kann mittels *Bias*-Strom die Größe des aktiven Widerstandes im so genannten *Rbias*-Modus beeinflusst werden, siehe dazu auch Abbildung 5.5. Grundsätzlich können die 64 Elektroden des Sensors über ihre jeweilige Schaltergruppe für unterschiedliche Betriebsmodi konfiguriert werden.

Diese Elektroden werden standardmäßig über die Schaltergruppe mittels Koppelkondensator und aktivem Widerstand, auch AKTR, mit den nachfolgenden Komponenten verbunden. Diese auch als *Rbias*-Modus bezeichnete Hochpass-Ankopplung blockiert den Gleichanteil, unterdrückt mögliche niederfrequente Störungen des Elektrodensignals und vermeidet elektrochemische Vorgänge auf dem Chip. Alternativ kann der mittels FET realisierte AKTR durch einen getakteten Taster ersetzt werden. In dieser als *Switchbias*-Modus bezeichneten Betriebsart wird der Eingang des nicht invertierenden Verstärkers aufgrund

eines externen Taktes auf AGND getastet. Weiterhin kann ein extern bereitgestelltes Stimulationssignal im Stimulus-Modus zur Reizung der Zellkultur auf die Elektroden gegeben werden. Weitere Betriebsarten ermöglichen die direkte Elektrodenkopplung ohne Koppelkapazität, die Umgehung des Eingangsverstärkers sowie die alternative Nutzung des analogen Testbusses zur Signaleinspeisung.

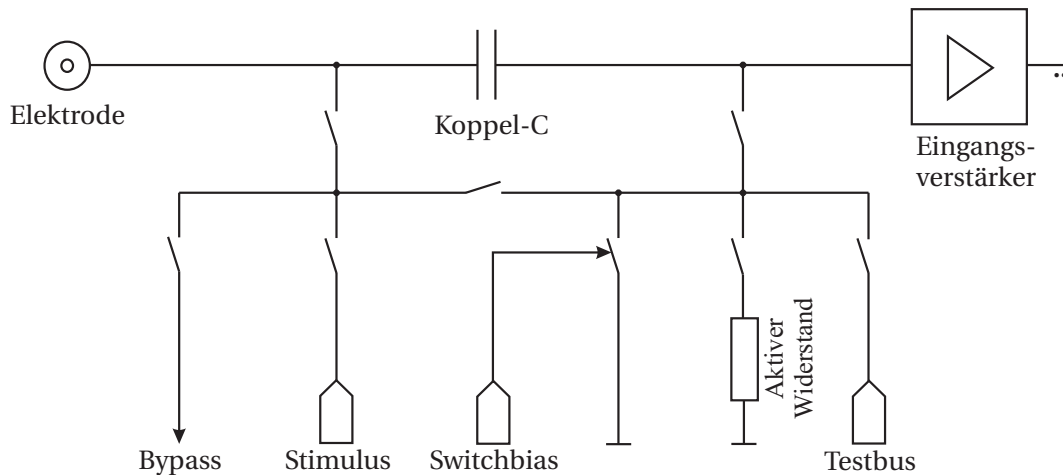


Abbildung 5.5: Prinzipdarstellung der Schaltergruppe des BISC 0201 bzw. 0202

Neben den Möglichkeiten der Elektrodenankopplung können die einzelnen Signalwege zusätzlich durch das Umgehen von aktiven Komponenten variiert werden. So können z. B. der Verstärker, das Filter oder der *Pad*-Treiber einzeln bzw. gemeinsam für jede Sensorelektrode aktiviert bzw. deaktiviert werden. Somit kann die Signalqualität und ergänzend auch die Stromaufnahme des Sensors variiert werden. Aufgrund der vielfältigen Sensorbetriebsarten, der optionalen Variationen der Signalwege, der Arbeitspunkteinstellung und der *Offset*-Kompensation ist die Chipkonfiguration mittels Benutzerinterface und I²C von zentraler Bedeutung für die praktische Nutzung des Sensors [310].

5.1.2 Erste Sensortestumgebung

Wie in Abschnitt 5.1.1 dargestellt, muss für die Nutzung des Neurosensors BISC 02 eine *Hardware*-Umgebung geschaffen werden. Zur Durchführung von *Wafer*-Tests während der Inbetriebnahme des CMOS-Sensors wurde deshalb zunächst auf einem Nadelkartenadapter eine entsprechende Schaltung realisiert. Diese Schaltung umfasste neben der Bereitstellung der digitalen und analogen Betriebsspannung, eine externe Stabilisierung der auf dem Chip generierten *Bandgap*-Spannung, eine Anschlussmöglichkeit für den I²C-Bus sowie Zugriffsmöglichkeiten auf Steuersignale des Sensors. Zudem können externe Signale für den *Switchbias*-Modus, für den analogen Testbus sowie für Stimulusexperimente angeschlossen werden. Diese Testumgebung gestattete auch die Auswertung einer Reihe von Kontrollsignalen, wie z. B. die *MuxInPins*. Für eine störungsfreie Kommunikation musste die I²C-Zuleitung dabei so kurz wie möglich ausfallen [310].

Basierend auf diesem Adapter erfolgte die Realisierung einer Schaltung zum Test aufgebauter Chips. Das Silizium wurde hierzu in einem 68 poligen CLCC (*Ceramic Leadless Chip Carrier*)-Standardgehäuse integriert. Schaltungstechnisch wurde zunächst die externe *Bandgap*-Stabilisierung der neuen Testumgebung für einen höheren Laststrom optimiert. Zusätzlich wurden Spannungsfolger zum optionalen Auskoppeln von Sensorsignalen integriert. Zur Untersuchung einzelner Signale kann die Messschaltung mittels *Jumper* aufgetrennt werden. Eine galvanische Trennung des I²C-Busses zwischen PC und BISC 02 gewährleistet nun eine zuverlässige Chipkonfiguration. Speziell für diese Messumgebung wurde eine Spannungsversorgung mit geringer Restwelligkeit entworfen und realisiert. Entsprechend der analogen und digitalen Betriebsspannung des Sensorchips steht neben der analogen Masse eine getrennte DGND (*Digital Ground*) zur Verfügung. Somit können die analogen und digitalen Schaltungsteile des Sensors getrennt versorgt werden [316].

Mögliche *Offsets* der Eingangsverstärker des Neurosensors können bei einer größeren Verstärkung zu einer Übersteuerung der nachfolgenden analogen Chipkomponenten führen. Daher ist eine effektive *Offset*-Kompensation für den Sensorbetrieb wichtig. Das aus einer *Bandgap* gewonnene Referenzpotential AGND des Sensors kann massefreie bzw. *Floating Ground* Signalgeneratoren oder Signalanpassungen erfordern, um analoge Testsignale geeignet in den Testbus des Sensors einzuspeisen. Eine solche Konditionierung kann z. B. mittels Spannungsteiler, kapazitiver Signalkopplung oder OPV-Schaltungen erfolgen [316]. Diese besondere Signalein- und -auskopplung ist auch zur Vermeidung von Kurzschlüssen zu beachten [5, 310, 316].

Aufbauend auf diesen ersten Sensortestumgebungen wurde eine *Hardware* entwickelt, welche zusätzlich eine externe Konditionierung und Digitalisierung der MEA-Signale sowie die Auswertung der FET-Sensoren des BISC 02 innerhalb eines *Cell Monitoring System* ermöglicht. Diese auch als Neuromessadapter bezeichnete *Hardware* wird in Abschnitt 5.2 mit ihren wesentlichen Komponenten vorgestellt. Der NMA gestattet zusammen mit einem FPGA- und einem USB-Modul auch den Transfer von Sensordaten per USB 2.0 auf einen Messrechner. Die hierfür notwendige *Software*-Implementierungen werden im Abschnitt 5.3 beschrieben. Eine Darstellung des Gesamtsystems ist in Anhang B enthalten.

5.1.3 Messergebnisse

Zunächst erfolgte die grundlegende Inbetriebnahme des Sensors. Dazu gehörte u. a. die Realisierung einer ersten Sensorumgebung mit der Möglichkeit der I²C-Konfiguration. Im Anschluss wurde die Verifikation der Sensorfunktionen durchgeführt, wozu z. B. das Ermitteln von Kennlinien der aktiven Chipkomponenten und die Bestimmung der Elektrodenimpedanzen gehörte. Die verwendeten Testsignale wurden dabei entweder direkt über eine Referenzelektrode und PBS (*Phosphate Buffered Saline*) bzw. über den analogen Testbus des Sensors eingespeist. Aufbauend auf diesen Ergebnissen wurden die notwendigen *Hardware*-Komponenten für einen kompakten Messaufbau, dem Neuromessadapter, entworfen und realisiert, siehe dazu auch Abschnitt 5.2.

5.1.3.1 Elektrodenarray

Da meist die Elektroden des Mikroelektrodenarrays für Messaufgaben verwendet wurden, kam der Untersuchung der Elektrodeneigenschaften, speziell der Impedanz, eine besondere Bedeutung zu. Wie in Abbildung 5.6 vereinfacht dargestellt, fällt die Spannung eines extrazellulär gemessenen Aktionspotentials über einem Spannungsteiler bestehend aus der Elektrodenimpedanz und der Impedanz des nachfolgenden Verstärkereingangs ab. Durch eine gegenüber der Verstärkereingangsimpedanz möglichst kleinen Elektrodenimpedanz kann die Dämpfung des gemessenen Aktionspotentials reduziert werden.

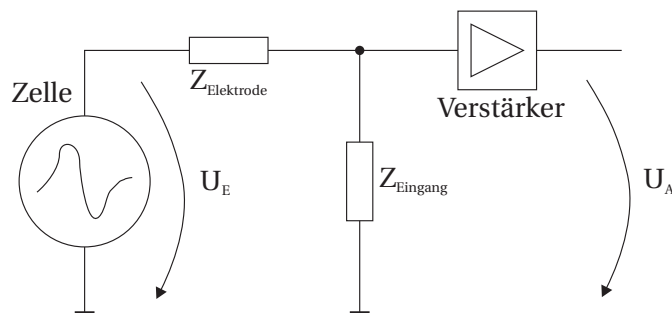


Abbildung 5.6: Ersatzschaltbild für die Messung der elektrischen Aktivität einer Zelle

Die verwendete Messanordnung zur Erfassung der Elektrodenimpedanz ist in Abbildung 5.7 dargestellt. Zur Vermeidung eventueller Einflüsse aktiver Chipkomponenten wurde nur die Impedanz der direkten Elektroden ohne *on chip* Elektronik ermittelt. Da alle MEA-Elektroden des Sensorchips mit der gleichen Technologie gefertigt wurden, lassen sich die so ermittelten Impedanzen auch auf die 64 MEA-Elektroden mit *on chip* Signalkonditionierung übertragen. In der Abbildung 5.8 sind die Ergebnisse dieser Untersuchungen für jeweils eine Elektrode von drei ausgewählten Chips zusammengefasst.

Die Impedanzmessung erfolgte mittels Solartron 1260 [317]. Das Sinussignal des Solartron-Generators hatte während der Impedanzmessung eine Spitzenspitzenspannung von 170 mV bzw. eine Effektivspannung von 60 mV und wurde in seiner Frequenz von 1 Hz bis 100 kHz verändert. Die Einspeisung erfolgte über eine Ag/AgCl-Referenzelektrode und PBS. Diese Referenzelektrode wies dabei eine Länge von ca. 28 mm, einen Durchmesser von 0,5 mm und somit eine resultierende Oberfläche von ca. 90 mm² auf. Die im Array angeordneten Mikroelektroden besaßen eine Oberfläche von jeweils ca. 133 μm².

Eine Beschichtung der Elektroden mittels Platin ermöglicht eine Verringerung der Elektrodenimpedanz, da diese poröse Schicht bei gleicher Grundfläche der Elektrode deren Oberfläche vergrößern und somit die Impedanz reduzieren kann. Das Beschichtungsprinzip ist in Abbildung 5.9 zu sehen. Ein über LabVIEW[®] angesteuertes Multifunktionsmodul [318] gab eine Spannung aus, welche eine externe Stromquelle ansteuerte. Deren Strom wurde über eine Platinreferenzelektrode in eine mit Wasser im Verhältnis 5:1 verdünnte Platin-K-Lösung [319] eingespeist. Die zu beschichtende Elektrode wurde über einen Schutzwiderstand von 1 MΩ auf Masse referenziert. Während der Beschichtung wurden die Spannung über der Beschichtungsstrecke und der angewendete Strom überwacht [320].

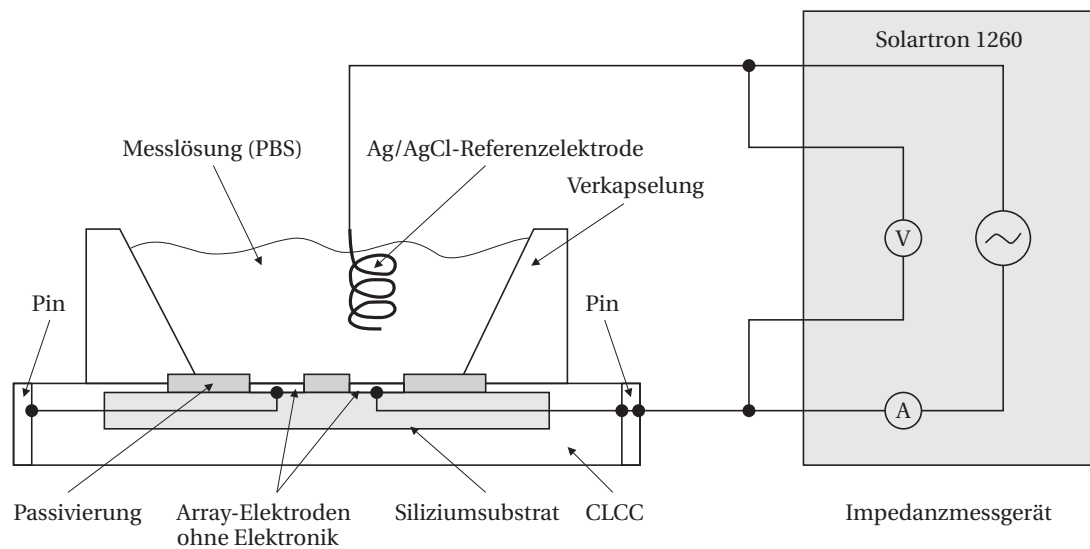


Abbildung 5.7: Prinzip der Elektrodenimpedanzmessung

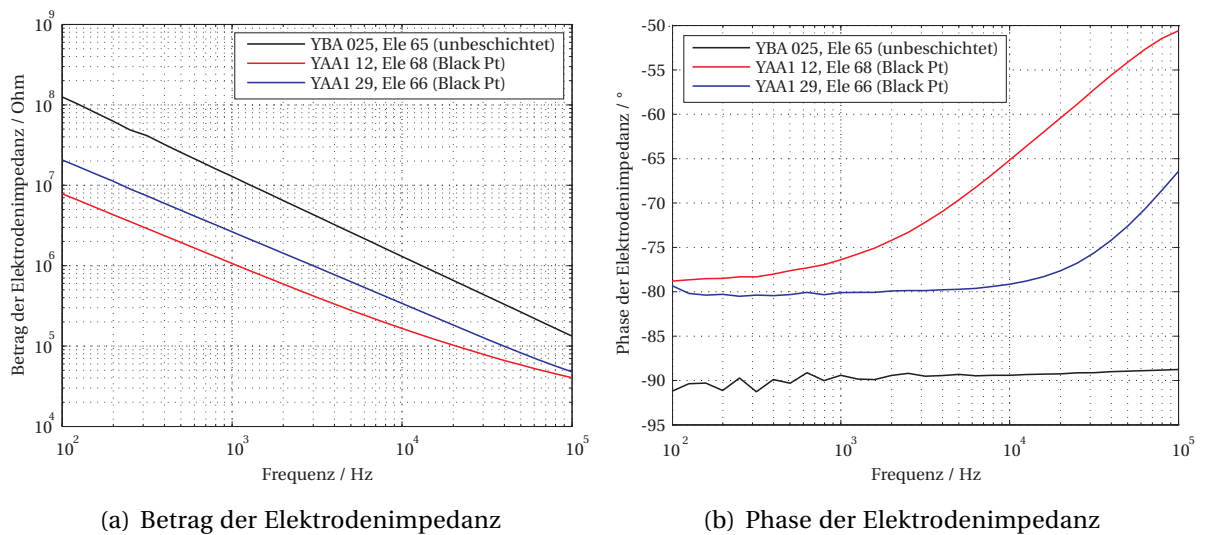


Abbildung 5.8: Impedanzen einzelner Elektroden ausgewählter Chips

Chip- und Elektrodenbezeichnung	Beschichtung	Wert der Impedanz bei 1 kHz	
Name	direkte Elektrode	(Black Pt)	
		Betrag / MΩ	Phase / °
YBA 025	65	nein	12,9 -89,8
YAA1 12	68	ja	1,1 -76,4
YAA1 29	66	ja	2,6 -80,1

Tabelle 5.1: Elektrodenimpedanz unterschiedlicher Chips bei einer Frequenz von 1 kHz und einem Elektrodendurchmesser von 13 μm

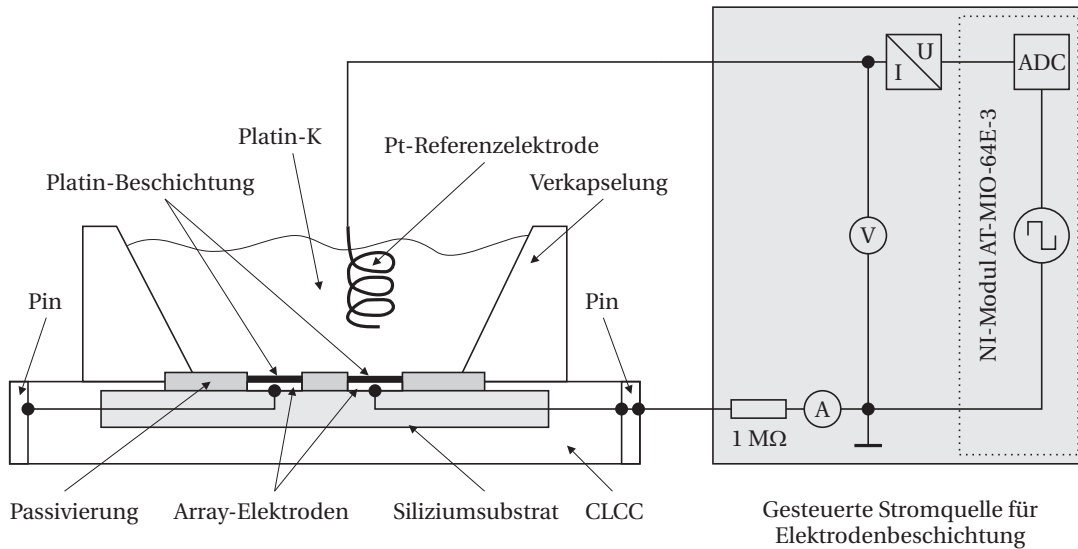


Abbildung 5.9: Prinzip der Elektrodenbeschichtung mit Platin

Das bipolare Rechtecksignal zur Ansteuerung der Stromquelle besaß eine Amplitude von 2,4 V. Die Dimensionierung der Stromquelle ermöglichte damit die Ausgabe eines Stromes von 2,4 μ A. Das Rechtecksignal besaß ein Tastverhältnis von 1:3 und eine Frequenz von 249 Hz. Vor der Elektrodenbeschichtung wurde die Chipoberfläche für jeweils 5 min mit 20 μ l 1 M NaOH aktiviert. Nach einer Reinigung mit Reinwasser und der Zugabe von 20 μ l 0,1 % NaOAc und 180 μ l verdünntem Platin-K konnte die Beschichtung durchgeführt werden. Anhand der Abbildung 5.8 kann man erkennen, dass sich die Elektrodenimpedanz mit dieser Beschichtungsmethode um eine Größenordnung reduzieren ließ. In der Tabelle 5.1 sind die Impedanzen einzelner Elektroden exemplarisch für eine Frequenz von 1 kHz aufgeführt. Aufgrund der Variation der Elektroden Eigenschaften sowohl von Elektrode zu Elektrode als auch von Chip zu Chip sollten die absoluten Messwerte vorsichtig interpretiert werden.

5.1.3.2 Aktive Sensorkomponenten

Mithilfe der Sensortestumgebung konnten alle Komponenten des BISC 02 angesprochen und ausgemessen werden. Zunächst wurde die stufig änderbare Verstärkung der Eingangsverstärker des Chips erfasst. Anschließend wurde das Verhalten der Schaltergruppe zwischen Elektrode und Elektronik auf dem Chip getestet. Hierzu wurde ein Testsignal mittels Messspitze direkt auf die Elektroden des MEA eingekoppelt. Dieses Signal gelangte im *Rbias*-Modus über einen Eingangshochpass gemäß Abbildung 5.18 zur nachfolgenden Konditionierung auf dem Chip. Weiterhin wurde der *Switchbias*- und Stimulus-Modus mit der entsprechenden Konfiguration der Schaltergruppe, siehe auch Abbildung 5.5, in seiner Funktion überprüft. Eine systematische Untersuchung der letztgenannten Modi unterblieb aus Zeitgründen.

Weiterhin wurde die Kennlinie der *on chip* Filter bestimmt. Gemeinsam mit dem Eingangshochpass kann dieser Tiefpass zur Bandbegrenzung des Messsignals genutzt werden. Der Bandpass lässt sich mittels *Chip-Bias* verändern. Schließlich wurde die Bandbreite und das Einschwingverhalten des *Pad*-Treibers untersucht. Das Einschwingverhalten dieses Treibers beeinflusst die maximal mögliche Schaltfrequenz des vorherigen Multiplexers und somit die maximale Abtastfrequenz des Signals. Neben diesen ersten Messungen erfolgten auch Untersuchungen zur *Offset*-Kompensation der auf dem Chip vorhandenen OPV (Operationsverstärker). Die Ergebnisse flossen in die Überarbeitung einiger Details des Neurosensors ein. Der Nachfolger BISC 0202 wurde in ähnlicher Weise in Betrieb genommen, wobei diese Resultate das Verhalten des BISC 0201 bestätigen konnten. Diese Untersuchungen wurden bereits in [310] beschrieben.

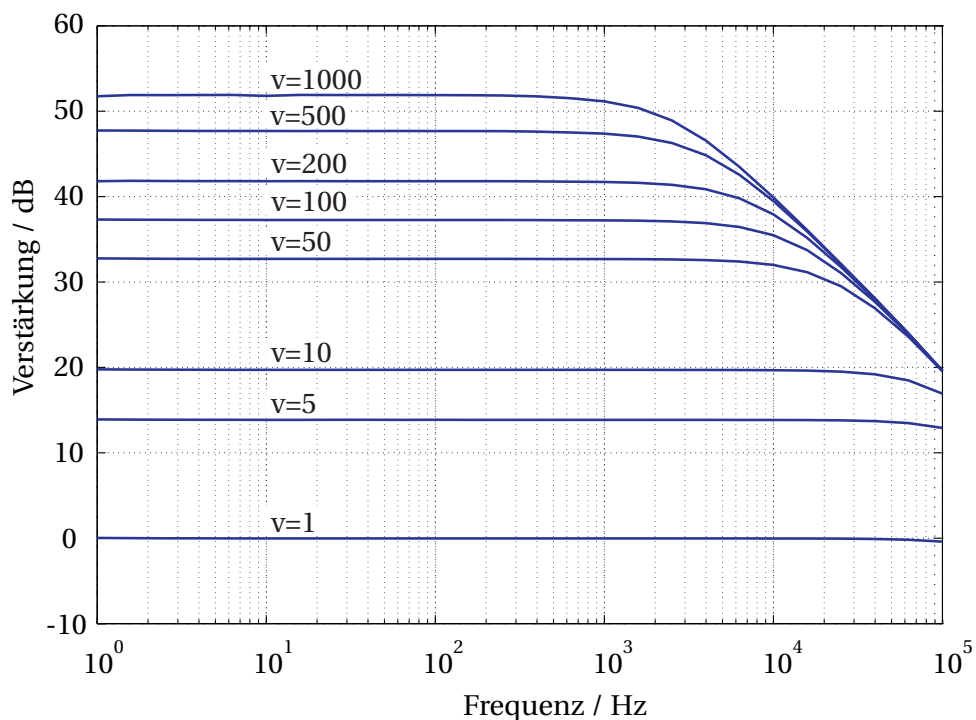


Abbildung 5.10: Verlauf des Amplitudengangs des *on chip* Verstärkers für die Verstärkungen 1, 5, 10, 50, 100, 200, 500 und 1000

In der Abbildung 5.10 sind die gemittelten Amplitudengänge der Verstärker des BISC 0202 für alle Verstärkungen dargestellt. Es lassen sich acht Verstärkungen zwischen nominal eins und tausend auswählen. Die gemessene Verstärkung ist gerade bei großen nominellen Werten kleiner als die gewählte Einstellung und beträgt maximal rund 400. Dieses Verhalten ist aus technologischen Gründen erwartet worden. In der Abbildung 5.11 ist der gemittelte Amplitudengang des Tiefpassfilters zu sehen. Der Butterworth-Filter zweiter Ordnung weist dabei eine Grenzfrequenz von ca. 5 kHz auf. Die projektierte Grenzfrequenz liegt dagegen bei 6 kHz. Der gemittelte Verlauf des Amplitudenganges des *Pad*-Treibers wird in der Abbildung 5.12 gezeigt. Aufgrund der höheren dynamischen Anforderungen besitzen die *Pad*-Treiber gegenüber den Verstärkern bzw. Filtern eine deutlich größere Bandbreite. Somit kann deren Ausgangssignal schneller einschwingen.

Die Signalein- und -ausgabe während dieser Untersuchungen erfolgten über den analogen Testbus des Sensorchips. Nicht benötigte Chipkomponenten wurden deaktiviert und umgangen. Die Messung erfolgte bei der *Bias*-Standardeinstellung des Chips. Die Verstärker- und Filterkennlinien wurden bis zu einer Frequenz von 100 kHz ausgemessen. Die *Pad*-Treiber wurden bis 10 MHz untersucht. Bei diesen Messungen kam erneut das Solartron 1260 zur Anwendung. In einer weiteren Messung wurde der *Rbias*-Modus des Chips untersucht. Dabei wurde das Testsignal mittels Ag/AgCl-Referenzelektrode und PBS auf die MEA-Elektroden gegeben, eine Verstärkung von $\nu = 1$ gewählt sowie Filter und Multiplexer des BISC 02 aktiviert. Eine direkte Kontaktierung des MEA der aufgebauten Chips war aus verfahrenstechnischen Gründen nicht möglich. Die Eigenschaften des PBS sowie die Elektrodenimpedanz haben daher einen zusätzlichen Einfluss auf die Kennlinien.

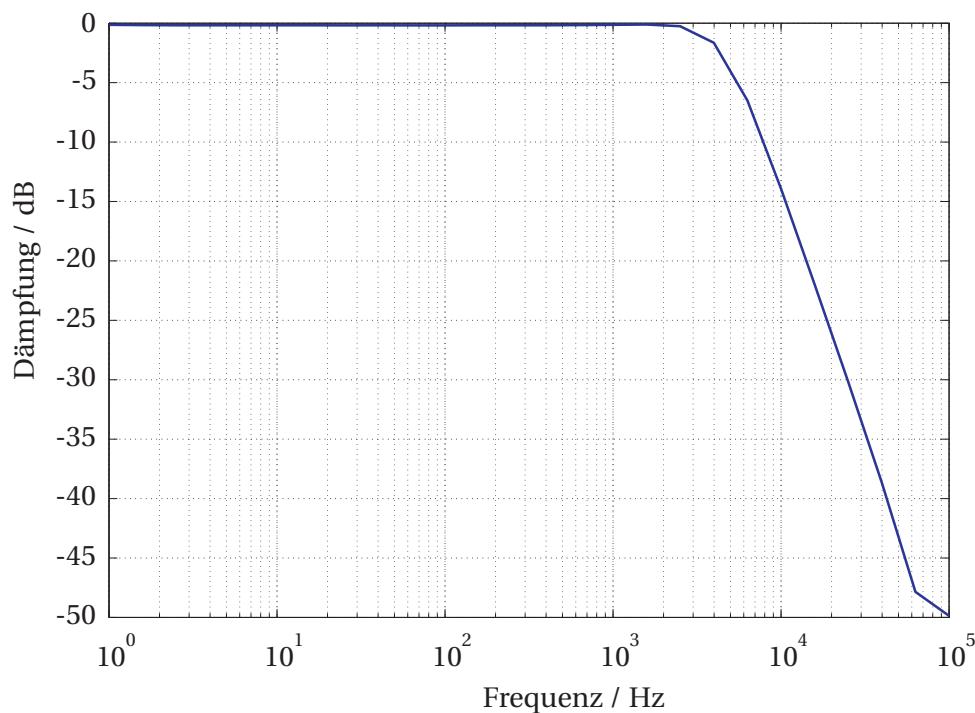


Abbildung 5.11: Verlauf des Amplitudengangs des *on chip* Tiefpasses ($\nu = -1$)

Im *Rbias*-Modus wird das Elektrodensignal über einen Hochpass ausgekoppelt, dessen Charakteristik über die *Bias*-Einstellungen des dazugehörigen, aktiven Widerstandes variiert werden kann. Dieser Widerstand wird durch einen FET realisiert, der im Widerstandsbereich seiner Kennlinie betrieben wird. Gemeinsam mit dem nachfolgenden Tiefpass kann eine Bandbegrenzung des Messsignals erfolgen. Das Signal wurde über den analogen Testbus ausgegeben und mit dem Solartron 1260 ausgewertet. In Abbildung 5.13 sind die Amplitudengänge der *Rbias*-Messung dargestellt. Es wurde hier exemplarisch eine MEA-Elektrode eines Chips bei minimaler, standardmäßiger und maximaler *Bias*-Konfigurationen untersucht. In Abhängigkeit dieser Einstellung lässt sich die Grenzfrequenz des Hochpasses innerhalb eines Bereiches von 200 Hz bis 600 Hz ändern. Die Grenzfrequenz des Tiefpasses verbleibt dagegen unverändert bei etwa 5 kHz. Die Bandbreite eines MEA-Elektrodensignals variiert so zwischen etwa 4,4 kHz und 4,8 kHz.

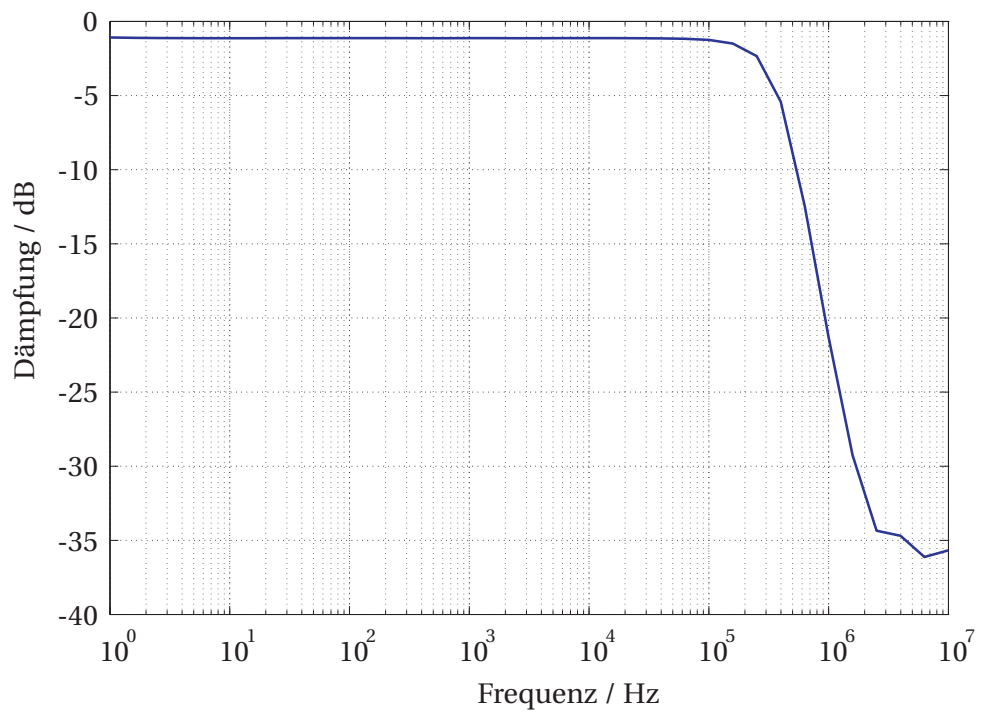


Abbildung 5.12: Verlauf des Amplitudengangs des *on chip Pad*-Treibers ($v = -1$)

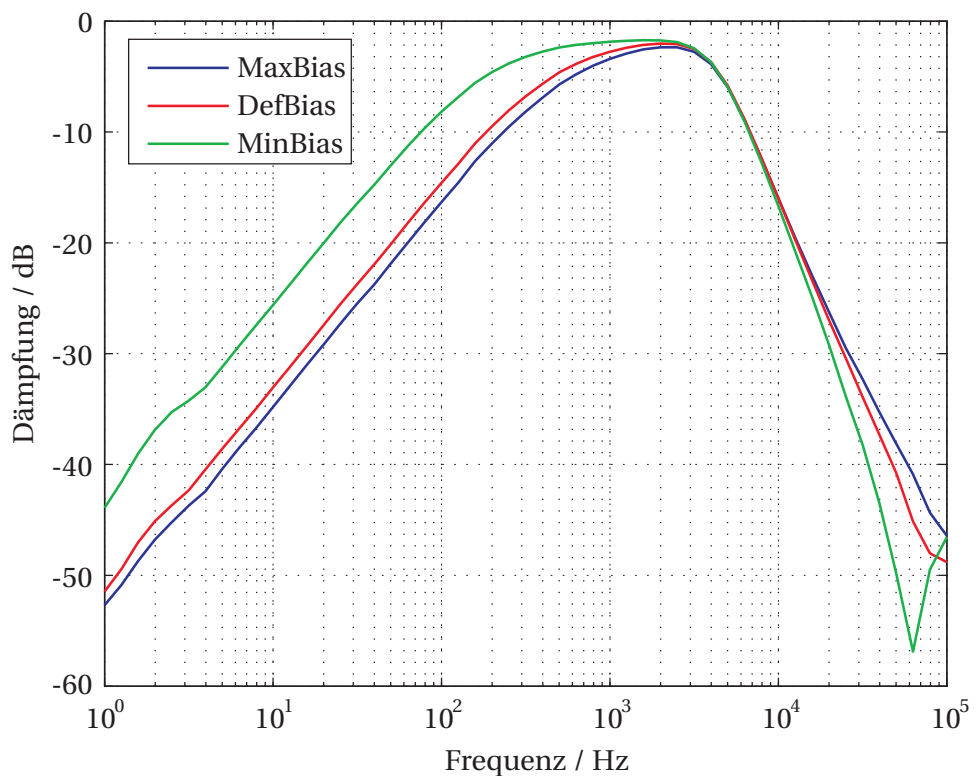


Abbildung 5.13: Exemplarischer Amplitudengang des Elektrodensignals im *Rbias*-Modus mit anschließender Tiefpassfilterung für unterschiedliche *Bias*-Optionen, YAA1-02, Kanal 1

Ausgehend vom Amplitudengang des *Pad*-Treibers und seiner Grenzfrequenz von etwa 350 kHz kann seine Einschwingzeit entsprechend Abbildung 5.14 abgeschätzt werden. Die theoretisch kürzeste Einschwingzeit des Treibers ergibt sich nach der Gleichung $t_e = \pi/\omega_g$ [4] und beträgt 1,43 μs . Dieser Schätzwert stimmt gut mit den tatsächlich ermittelten Einschwingzeiten t_e gemäß Tabelle 5.2 überein. Bei dieser Messung wurden unterschiedliche Signalamplituden über den analogen Testbus auf die Multiplexer des Chips gegeben. Die Verstärker und Filter des Sensors waren dabei aktiv. Unter der Annahme, dass das über MUX und *Pad*-Treiber ausgegebene Sensorsignal innerhalb der Hälfte des für die Digitalisierung zur Verfügung stehenden Zeitfensters eingeschwungen sein soll, könnte jede MEA-Elektrode mit bis zu 46,6 kHz abgetastet werden.

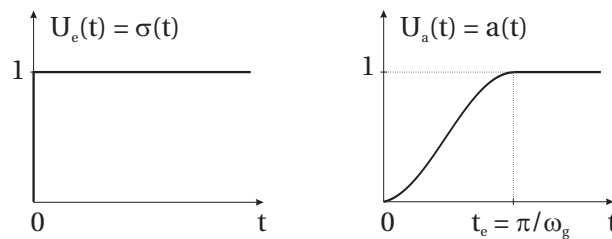


Abbildung 5.14: Sprungantwort und Einschwingzeit eines Tiefpasses nach [4]

Chipbezeichnung	<i>Bias</i> -Einstellungen		
	Minimal	Standard	Maximal
YAA1 04			
$t_e / \mu\text{s}$	5,4	1,66	1,34
$2t_e / \mu\text{s}$	10,8	3,32	2,68
f_{MUX} / kHz	92,6	301,2	373,1
f_{MUXch} / kHz	11,6	37,7	46,6

Tabelle 5.2: Exemplarische Einschwingzeiten und mögliche Abtastraten für den Sensorchip YAA1 04 unter Berücksichtigung unterschiedlicher *Bias*-Einstellungen

Chipbezeichnung	<i>Bias</i> -Einstellungen		
	Minimal	Standard	Maximal
YAA1 04			
I / mA	22,0	55,5	71,6
P / W	0,18	0,44	0,57

Tabelle 5.3: Exemplarische Strom- und Leistungsaufnahme für den Sensorchip YAA1 04

Die Stromaufnahme des Sensorchips lässt sich ebenfalls über die *Bias*-Einstellungen variieren, wobei keine Abhängigkeit zum extern angelegten Multiplexer-Takt auftritt. Die in Tabelle 5.3 dargestellte Messreihe wurde exemplarisch an dem Chip YAA1 04 aufgenommen. Alle aktiven Komponenten des Chips wurden dabei in Betrieb genommen und die I²C-Register regelmäßig ausgelesen. Über den analogen Testbus wurde an jeden zweiten Eingangverstärker des Sensors eine Gleichspannung von 5 mV angelegt und $\nu = 10$ gewählt.

Die restlichen Kanäle verblieben auf AGND, um den Einfluss der MUX-Umschaltungen auf die Stromaufnahme zu untersuchen. Die Ergebnisse zeigen, dass die Leistungsaufnahme des Chips unabhängig vom Multiplexerbetrieb ca. 0,6 W nicht überschreitet.

5.1.3.3 Abschätzung des Rauschens

In einem Vorgriff auf den Abschnitt 5.2 wurde in einer weiteren Untersuchung das Rauschen des gesamten Sensorsystems abgeschätzt. Das System bestand dabei aus dem Neurochip BISC 02, einer externen *Hardware* zur zusätzlichen Signalkonditionierung und Digitalisierung sowie einem FPGA (*Field Programmable Gate Array*)-Board, welches den Transfer der Messdaten auf einen Rechner realisierte, siehe auch Abbildungen 5.18 für eine Prinzipdarstellung der Anordnung. Die bekannten Verstärkungen auf dem Chip und auf der externen *Hardware* sowie der Eingangsspannungsbereich und die Auflösung der genutzten AD-Wandler gestatteten eine korrekte Skalierung des digitalisierten Zeitsignals für die weitere Verarbeitung. Bei der Analyse des Rauschsignals erfolgte keine zusätzliche digitale Filterung. Die Resultate dieser Rauschuntersuchung werden auch in die Auswertung von Detektions- und Klassifikationsverfahren im Abschnitt 6.3 einfließen.

Es wurden insgesamt drei Chips in zwei verschiedenen Betriebsmodi getestet. Zunächst wurden die Chips im Standardmodus *Rbias* verwendet. Die Signale der MEA-Elektroden wurden dabei mittels RC-Hochpass ausgekoppelt, *on chip* verstärkt, mittels Tiefpass gefiltert, extern verstärkt, digitalisiert und per USB kontinuierlich auf den Messrechner übertragen und gespeichert. Somit kann das Chipverhalten mit MEA und Signalkonditionierung sowie der Einfluss der externen Elektronik erfasst werden. In einem weiteren Modus wurde der analoge Testbus des BISC 02 zur direkten Signaleinspeisung genutzt. Unter Umgehung der MEA-Elektroden und des Hochpasses wurde an den Eingangverstärker des Chips AGND angelegt. Die nachfolgenden *on chip* Filter und Multiplexer waren aktiv. Hier wurde ausschließlich der Einfluss der Chip-Elektronik und der Einfluss der externen Hardware untersucht. In beiden Fällen befand sich PBS im Chiptrog, welches über eine Platinelektrode auf AGND referenziert wurde. Der Chip selbst war abgedunkelt. Die Messungen erfolgten im *Default Bias* und bei Raumtemperatur.

Vor jeder Messung wurde automatisch eine *Offset*-Kompensation auf dem Chip durchgeführt und ggf. die Verstärkung einzelner Sensorkanäle angepasst. Ein Signalausschnitt von jeweils 10 s wurden in MATLAB[®] eingelesen und skaliert. Da die *Offset*-Kompensation auf dem Chip nur in Stufen erfolgen kann, wurden jeweils vor der Ermittlung des Effektiv- und des Spitzenspitzenwertes (*Peak-Peak*) des Zeitsignals eventuell vorhandene Offsets oder Driften rechnerisch entfernt. Das Amplitudenspektrum des Rauschens wurde exemplarisch aus einem 120 s langen Signalausschnitt mittels gefensterter STFT (*Short Time Fourier Transformation*) berechnet und gemittelt. Zur Nutzung eines möglichst großen Teils des Eingangsspannungsbereiches der AD-Wandler von 2,5 V wurde die größte Chipverstärkung von real ca. 400 und die elffache Verstärkung der externen *Hardware* zur Datenakquise genutzt. Die Signale wurden mit 33,3 kHz abgetastet und mit 14 Bit quantisiert.

Chip	Kanal	$U_{spitzespitze} / \mu\text{V}$	$U_{eff} / \mu\text{V}$
YAA1 29	5	174,2	19,6
YAA1 29	16	183,3	21,2
YAA1 34	36	121	13,4
YAA1 34	50	132,2	15,7
YAB1 35	11	181,8	20
YAB1 35	44	154,8	17,9

Tabelle 5.4: Exemplarische Rauschspannungen im *Rbias*-Modus

Chip	Kanal	$U_{spitzespitze} / \mu\text{V}$	$U_{eff} / \mu\text{V}$
YAA1 29	5	75	9,9
YAA1 29	16	99	11,8
YAA1 34	36	64,7	7,1
YAA1 34	51	75,9	8,7
YAB1 35	11	87,3	10,5
YAB1 35	44	74,2	9,6

Tabelle 5.5: Exemplarische Rauschspannungen im *Testbus*-Modus

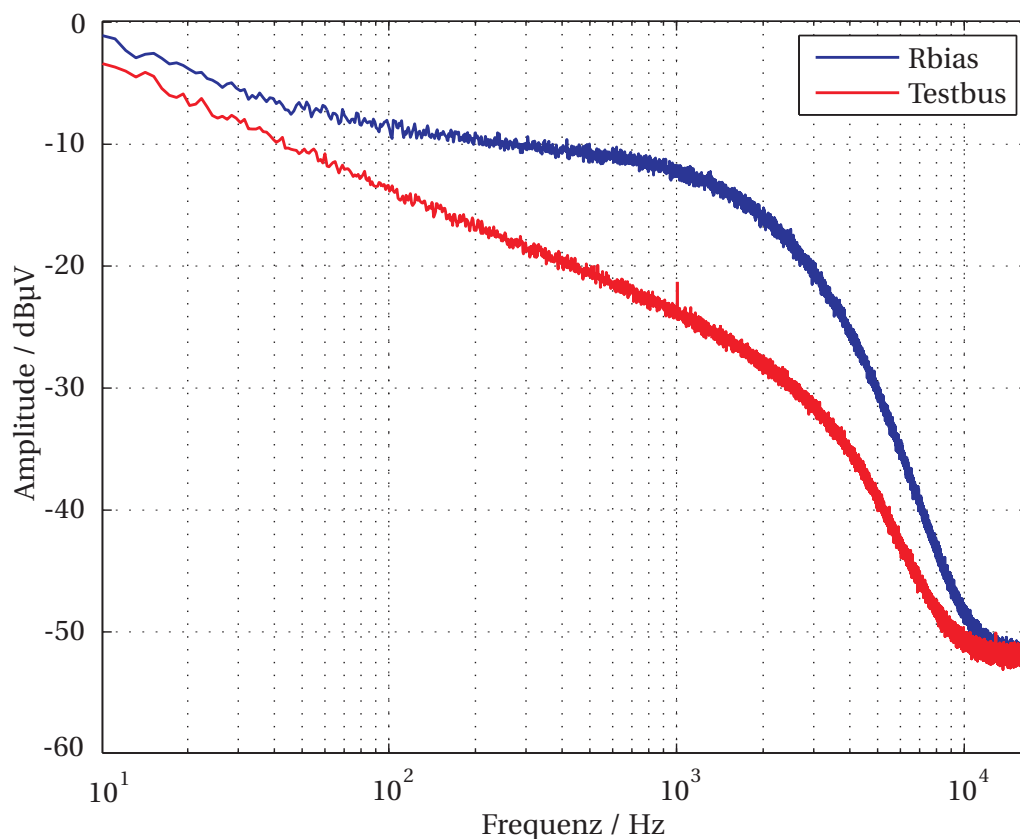
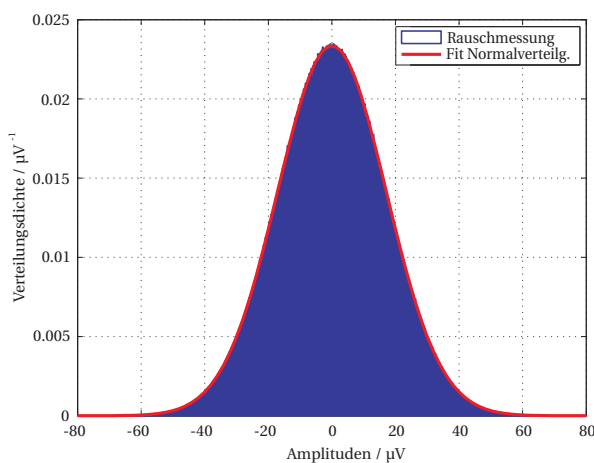
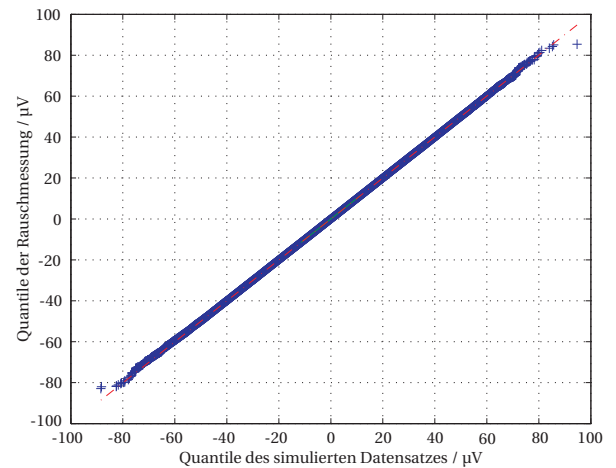


Abbildung 5.15: Exemplarisches Amplitudenspektrum des Sensorrauschens im *Rbias*- und *Testbus*-Modus, YAA1-34, Kanal 2

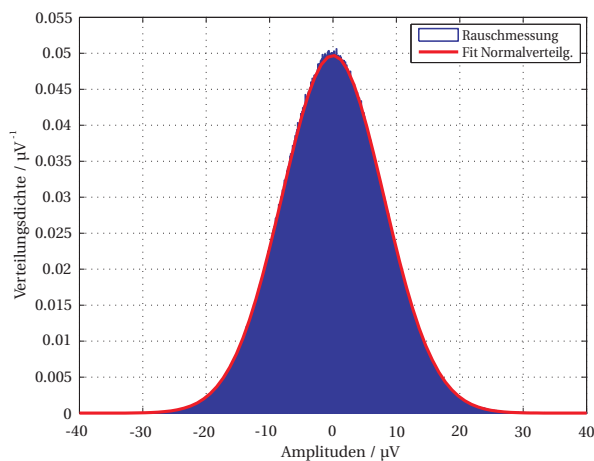


(a) Verteilungsdichte der Rauschmessung

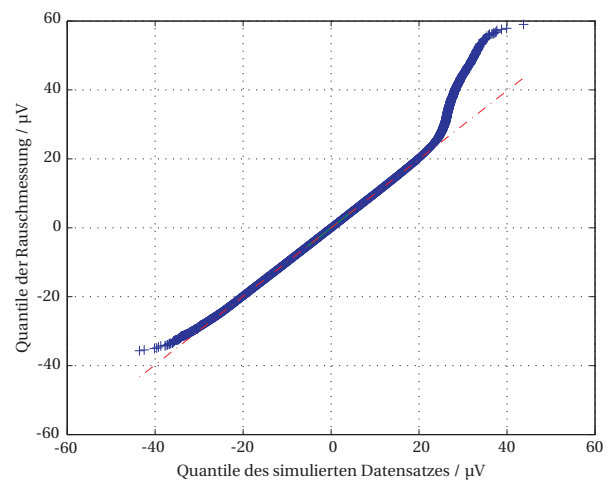


(b) Quantil-Quantil-Plot

Abbildung 5.16: Exemplarische Verteilungsdichte der Messwerte, $\hat{\mu} = 0$, $\hat{\sigma} = 17,1 \mu\text{V}$, einer *Rbias*-Rauschmessung, YAA1-34, Kanal 2, und Quantil-Quantil-Plot unter Nutzung dieser Messung und simulierten, normalverteilten Daten. Die Dauer der Rauschmessung betrug bei einer Abtastrate von 33,3 kHz 120 s. Mittels *Fit* dieser Messdaten wurden die Parameter der korrespondierenden Normalverteilung geschätzt, welche zur Simulation der Vergleichsdaten genutzt wurde.



(a) Verteilungsdichte der Rauschmessung



(b) Quantil-Quantil-Plot

Abbildung 5.17: Exemplarische Verteilungsdichte der Messwerte, $\hat{\mu} = 0$, $\hat{\sigma} = 8 \mu\text{V}$, einer *Testbus*-Rauschmessung, YAA1-34, Kanal 2, und Quantil-Quantil-Plot unter Nutzung dieser Messung und simulierten, normalverteilten Daten. Die Dauer der Rauschmessung betrug bei einer Abtastrate von 33,3 kHz 120 s. Mittels *Fit* dieser Messdaten wurden die Parameter der korrespondierenden Normalverteilung geschätzt, welche zur Simulation der Vergleichsdaten genutzt wurde.

In den Tabellen 5.4 und 5.5 sind exemplarisch die Spitzenspitzen- und die Effektivspannungen für jeweils zwei analysierte Kanäle der drei Chips dargestellt. Die Spitzenspitzenspannungen ergaben sich dabei als maximale Auslenkung des Signals. Die Effektivspannungen wurden als Euklidische Norm berechnet, welche durch die Wurzel der untersuchten Fensterlänge geteilt wurde. Da eingangs ein möglicher *Offset* rechnerisch entfernt wurde, entspricht die Effektivspannung in diesem Fall auch der Standardabweichung σ des Signals. Man kann erkennen, dass sich im *Testbus*-Modus die Spannungswerte gegenüber dem *Rbias*-Modus nahezu halbieren. Das im *Testbus*-Betrieb gemessene Rauschen lässt sich auf die *on chip* Elektronik der Signalkonditionierung und die verwendete externe *Hardware* zurückführen. Die im *Rbias*-Modus ermittelten größeren Rauschspannungen lassen vermuten, dass der *Bias*-Widerstand des RC-Hochpasses sowie die MEA-Elektroden in dieser Betriebsart wichtige Rauschquellen des Messsystems darstellen. Die besten Resultate der exemplarischen Rauschmessungen, z. B. Chip YAA1-34, Kanal 36, lassen sich mit Messergebnissen der Literatur annähernd vergleichen [48, 321].

Die Abbildungen 5.16 und 5.17 zeigen die Verteilungsdichten der zur Rauschabschätzung aufgenommenen Messwerte und deren Vergleich zur Normalverteilung. Dabei wurden exemplarisch für einen Chipkanal die Messreihen mit einer Länge von 120 s für eine *Rbias*- und eine *Testbus*-Messung in MATLAB[®] eingelesen und wie beschrieben skaliert. Anschließend wurde die Verteilungsdichte der Messwerte mittels Histogramm geschätzt, wobei die Breite und die Anordnung der verwendeten Klassen nach dem Freedman-Diaconis-Kriterium in Abhängigkeit des Datensatzes automatisch gewählt wurden. Basierend auf diesen Rauschmessungen wurden in einem weiteren Schritt mittels *Fit* die Parameter der entsprechenden Normalverteilungen geschätzt. In den Abbildungen 5.16(a) und 5.17(a) ist die gute Übereinstimmung der Messwertverteilung mit einer Normalverteilung zu erkennen. Die weitgehend vorhandenen Winkelhalbierenden der Quantil-Quantil-Plots unter Nutzung der Rauschmessungen und simulierter, normalverteilter Daten bestätigt dieses Ergebnis, siehe Abbildungen 5.16(b) und 5.17(b).

Die zwei Spektren in Abbildung 5.15 wurden mittels STFT berechnet, wobei die jeweils verwendeten 32768 Abtastwerte zuvor mit einem Hamming-Fenster gewichtet wurden. Die untersuchten Signalausschnitte wiesen dabei eine Überlappung von 50 % auf. Die so entstandenen 242 Spektren wurden gemittelt und als Amplitudenspektrum skaliert. Aufgrund der erzielten Frequenzauflösung wurden die Spektren erst ab einer Frequenz von 10 Hz abgetragen. Die Amplitudenspektren für die untersuchten Betriebsmodi weisen bis zu einer Frequenz von etwa 100 Hz das für CMOS-Operationsverstärker typische $1/f$ -Rauschen auf. Im *Rbias*-Modus geht der Verlauf des Amplitudenspektrums oberhalb von 100 Hz in weißes Rauschen über. Dieses Rauschen wird bei etwa 2 kHz bereits deutlich gedämpft, da die verwendeten Eingangsverstärker des BISC 02 bei ihrer maximalen Verstärkung eine Grenzfrequenz von 2 kHz besitzen und ihrer Übertragungsfunktion dann mit $20 \text{ dB}/\text{Dekade}$ abfällt, vergleiche dazu auch Abbildung 5.10. Der Verlauf des *Rbias*-Amplitudenspektrums wird dann ab etwa 5 kHz zusätzlich gedämpft, da der *on chip* Butterworth-Tiefpass zweiter Ordnung nun seine Grenzfrequenz erreicht, siehe auch Abbildung 5.11.

Der Verlauf des *Testbus*-Amplitudenspektrums weist bis etwa 2 kHz das typische $1/f$ -Rauschen auf, welches anschließend entsprechend stärker gedämpft wird. Der Widerstand des RC-Hochpasses als offensichtliche Rauschquelle des Messsystems ist im *Rbias*-Modus direkt an den *on chip* Eingangverstärker angeschlossen. Seine Rauschspannung wird somit nicht Hochpass-gefiltert. Auch das Rauschen der *on chip* CMOS-Komponenten entsteht erst nach dem Hochpass des *Rbias*-Modus. Da auch die externe Signalkonditionierung aufgrund des Multiplex-Betriebes auf dem Neurochip BISC 02 zur Gewährleistung eines optimalen Einschwingverhaltens keine weiteren Filter besitzt, weisen die Amplitudenspektren in der Abbildung 5.15 kein Hochpassverhalten auf. Die zusätzlich exemplarisch berechnete AKF (Autokorrelationsfunktion) des Rauschsignals weist mit ihrem symmetrischen Verlauf auf einen stationären Rauschprozess hin. Der Wert der AKF erreichte für die Verschiebung $\tau = 0$ wie erwartet den Wert der Varianz bzw. des Quadrats der Standardabweichung des Rauschens und nahm für wachsende τ rasch ab [322]. Die Untersuchungen zeigen auch, dass die externe Signalweiterverarbeitung die Bandbreite des Messsystems durch ihr Übertragungsverhalten wie angenommen nicht einschränkt.

5.2 Externe Signalaufbereitung und Digitalisierung

Aufgrund der vielfältigen Anbieter von *Hardware* zur externen Erfassung von Sensorsignalen, siehe auch Abschnitt 3.1.3.3, wurde früh eine Zusammenarbeit mit einem lokalen Partner angestrebt, um eine externe Signalaufbereitung, eine Digitalisierung und eine digitale Vorverarbeitung der BISC-Sensorsignale in einem kompakten Aufbau zu realisieren [323]. Zu einem späteren Zeitpunkt musste diese Entwicklung aber eigenständig fortgesetzt werden. Aufbauend auf den ersten Untersuchungen zum Neurosensor und ersten Entwürfen einer Sensortestumgebung gemäß Abschnitt 5.1.2 erfolgte eine schrittweise Entwicklung einer kompletten *Hardware*-Plattform, welche alle Sensorsignale erfassen und digitalisieren kann. Neben der Aufbereitung der MEA-Signale wurden auch die CPFET- und ISFET-Sensoren in die *Hardware*-Entwicklung mit einbezogen. Zudem wurde eine Temperaturmessung integriert sowie eine Option zur Stimulation der Zellkultur auf dem Sensorchip geschaffen [5].

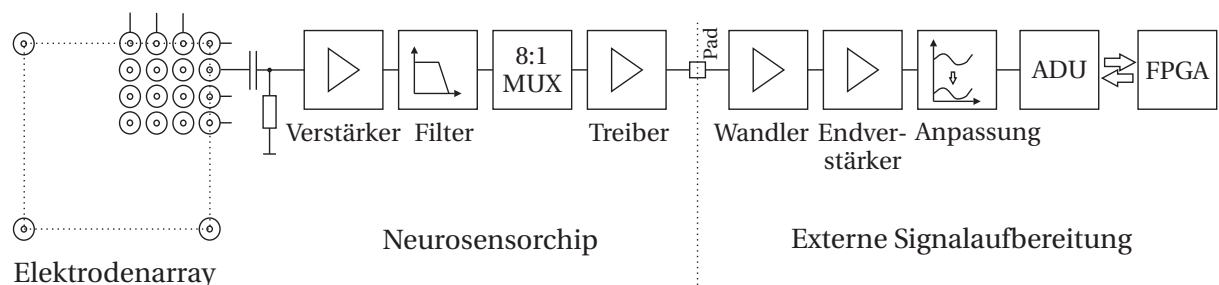


Abbildung 5.18: Prinzip der Signalverarbeitung für 64 MEA-Elektroden nach [5]

Teile der ersten Sensortestumgebung, die Spannungsversorgung und das I²C-Interface wurden übernommen, ggf. abgeändert und ergänzt. Die externe Schaltungsentwicklung für den BISC 02 vereinfachte sich gegenüber seinem Vorgänger SC1000N [324, 325], da eine erste analoge Signalkonditionierung für 64 der 68 Palladium-Elektroden bereits auf dem Sensorchip vorgenommen werden konnte. Zudem erfolgt die Ausgabe dieser aufbereiteten Elektrodensignale per Zeitmultiplexbetrieb, wodurch eine weitere Verringerung der externen Beschaltung erreicht wurde. Die Signale der 64 MEA-Elektroden verlaufen symmetrisch zu AGND. Dabei ist eine Signalverschiebung vor allem aufgrund des *Offset* der Verstärker des Neurosensors möglich. Zudem ist zu beachten, dass eine Filterung auf dem Chip das Einschwingverhalten der externen, analogen Schaltung beeinflussen kann [5].

Angesichts des Verstärkungsbandbreiteproduktes der externen NMA-Verstärker ist ein Kompromiss bezüglich des Eingangsruhestroms, des *Offset*-Verhaltens und der Dynamik bei der OPV-Auswahl erforderlich. Die Elektrodensignale werden nach der Ausgabe durch den Neurosensor extern auf dem NMA mittels Impedanzwandler quasi belastungsfrei angekoppelt und infolge möglicher Rausch- und *Offset*-Größen nur relativ geringfügig verstärkt. Schließlich erfolgt die Anpassung der Signalsymmetrie an den Eingangsspannungsbereich der eingesetzten AD-Wandler. Zur Vereinfachung der Schaltungsstruktur und des Datentransfers werden serielle Wandler eingesetzt, siehe auch Abbildung 5.18. Die vier vom Sensorchip direkt ausgegebenen Elektrodensignale werden zusätzlich mit einer externen analogen Signalkonditionierung versehen [5].

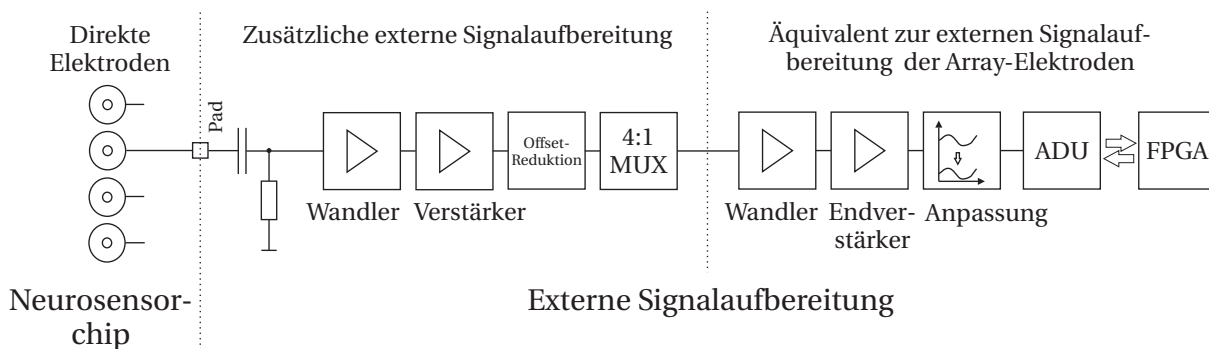


Abbildung 5.19: Prinzip der externen Signalverarbeitung der direkten Elektroden nach [5]

Die externe Beschaltung der vier direkten MEA-Elektroden basiert auf der vorherigen Sensorchipgeneration. Das MEA-Signal wird dabei mittels RC-Hochpass ($f_{\text{Grenz}} = 3,4 \text{ Hz}$) angekoppelt. Aufgrund des Messprinzips und der relativ hohen Elektrodenimpedanz, siehe u. a. Abbildung 5.6 und Tabelle 5.1, muss die externe Schaltung des NMA eine deutlich höhere Eingangsimpedanz aufweisen, was sich auf das Rauschverhalten der Schaltung auswirken kann. Nach einer Impedanzwandlung und der Anwendung eines verstärkenden Filters ($\nu = 11$) werden die vier Elektrodensignale zu einem Zeitmultiplexsignal zusammengefasst. Zuvor wird das bei dieser Signalaufbereitung entstandene *Offset* reduziert. Die Ansteuerung des externen Multiplexers erfolgt mit einer 2 Bit-Adresse. Nach diesem MUX existieren im Vergleich zu den verbleibenden 64 Elektroden identische Bedingungen, sodass deren externe Signalaufbereitung übernommen werden kann, siehe auch Abbildung 5.19 [5].

Auf dem BISC-Sensorchip befinden sich zudem ISFET-Sensoren zur Erfassung der stoffwechselbedingten Änderungsrate der zellulären Ansäuerungsleistung. Dieser Parameter lässt einen Rückschluss auf den pH-Wert der Zellkultur zu. Die Wasserstoffionenkonzentration wird mit einer ionensensitiven *Gate*-Beschichtung von FETs bestimmt. Diese Messung ist temperaturabhängig und wird durch eine Langzeitdrift des Sensors beeinflusst. Durch Vorgabe einer einstellbaren, konstanten *Drain-Source*-Spannung U_{DS} und des *Drain-Source*-Stromes I_{DS} sowie einer konstanten Substratspannung U_{BS} wird der Arbeitspunkt des ISFET-Sensors vorgegeben. Die Ionenkonzentration ist dann als zusätzlicher Anteil der *Gate-Source*-Spannung U_{GS} messbar [6], siehe auch Abbildung 5.20.

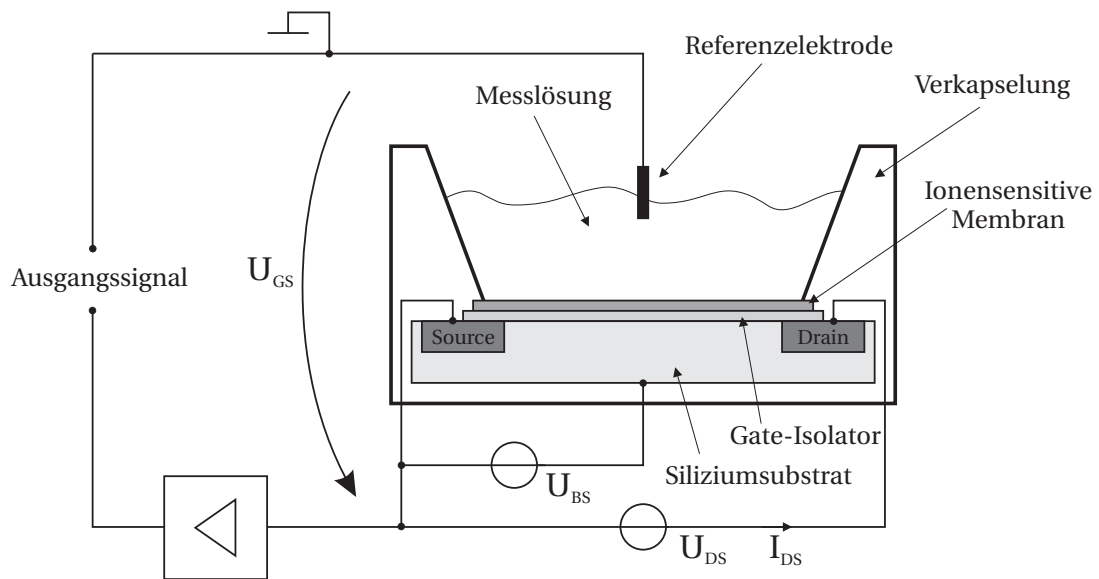


Abbildung 5.20: Messaufbau zur Erfassung des pH-Wertes nach [6]

Die ISFETs des BISC 02 besitzen ein Si_3Ni_4 -*Gate* und ermöglichen so bei 20°C in der Regel eine maximale pH-Empfindlichkeit von ca. $58 \text{ mV}/\text{pH}$. Eine Verunreinigung oder Oxidation der *Gate*-Fläche verringert diese Empfindlichkeit. Vor einer pH-Messung kann deshalb eine Aktivierung der *Gates* mittels NaOH sinnvoll sein. In einer Voruntersuchung der ISFETs des BISC 02 konnte diese Größenordnung der pH-Empfindlichkeit bestätigt werden. DA- und AD-Wandler dienen dabei der Vorgabe der Arbeitspunkte und dem Einlesen der Messergebnisse, vergleiche auch Abbildung 5.21 [5].

Trotz einer externen Temperaturregelung kann eine zusätzliche Temperaturmessung auf dem Neurosensor z. B. zur Kontrolle der Temperaturregelung oder zur Erfassung der Eigenwärmerzeugung des Sensorchips aufgrund der elektronischen Komponenten sinnvoll sein. Ein CPFET im Innenbereich des Sensorchips wird hierzu als Temperaturdiode TD beschaltet und gestattet die Auswertung der temperaturabhängigen Strom-Spannungskennlinie dieses pn-Übergangs. Die in diesem Fall zu erwartende Temperaturabhängigkeit liegt im Bereich von $-3,5 \text{ mV}/\text{K}$ bis $-2 \text{ mV}/\text{K}$. Der Arbeitspunkt der Diode wird mit dem Flussstrom I_{TD} und der Kathodenspannung U_{Kathode} vorgegeben. Die temperaturabhängige Durchlassspannung U_F kann dann ausgewertet werden. Auch hier werden DA- und AD-Wandler zur Vorgabe des Arbeitspunktes und zum Erfassen des Messergebnisses genutzt [5].

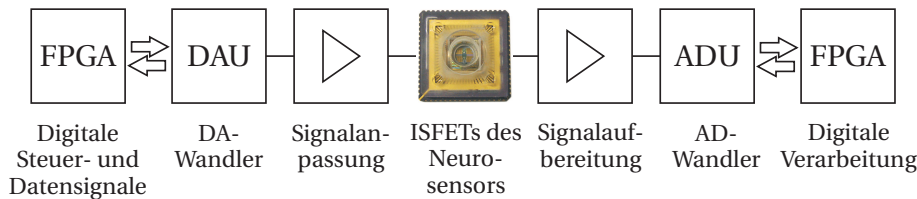


Abbildung 5.21: Prinzip der ISFET-Messung nach [5]

Für eine elektrische Reizung der auf dem Chip kultivierten Zellkultur kann ein externes Stimulussignal auf eine beliebige Anzahl von Elektroden des MEA gegeben werden. Zunächst müssen die zu den gewünschten Elektroden gehörenden Schaltergruppen auf dem Sensorchip mittels I²C-Register für den Stimulusmodus konfiguriert werden. Anschließend kann der Stimulus per BNC-Buchse bzw. mittels DA-Wandler eingespeist werden. Diese beliebige Signalform wird nach der Konditionierung symmetrisch zu AGND ausgegeben. Da bisher noch keine Charakterisierung des zu verwendenden Stimulussignals erfolgt ist, wurde unter Berücksichtigung der Eigenschaften von Aktionspotentialen ein DA-Wandler mit einer maximalen Umsatzrate von 100 kHz gewählt. Die Amplitude des Stimulus kann dabei bis zu 2,5 V betragen [5].

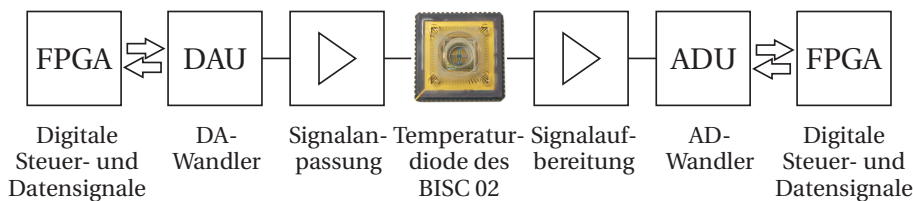


Abbildung 5.22: Prinzip der Temperaturmessung nach [5]

Der schaltungstechnische Prototyp des NMA ermöglicht die Anbindung des Neurochips BISC 02, die Erfassung der Elektrodensignale, eine Temperaturmessung, die pH-Messung, sowie eine Stimulation der Zellkultur. Optional können die im Rahmen dieser Arbeit nicht näher untersuchten CPFET mittels Aufsteckplatine angesteuert und deren Signale ausgewertet werden. Zusätzlich erlaubt das Messsystem eine I²C-Kommunikation zur Konfiguration des Sensorchips, stellt die externe AGND-Stabilisierung sicher und setzt die Pegel der digitalen Bus- und Steuersignale, wo erforderlich, zwischen 3,3 V und 5 V um. Eine definierte Schnittstelle zwischen dem NMA und der externen, digitalen Signalvorverarbeitung gestattet den Transfer der Messsignale. Dieser Prototyp wurde in ein standardisiertes Gehäuse integriert, wobei er an die vorhandene Temperaturregelung sowie den Heizaufsatz des Vorgängersensors SC1000N der Firma Bionas angepasst wurde [126, 324].

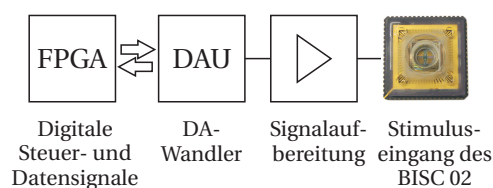


Abbildung 5.23: Prinzip der Generation des Stimulussignals nach [5]

Ergänzend zu den Arbeiten am Neuromessadapter wurde auch ein Modul zur digitalen Signalvorverarbeitung entwickelt, um die mittels NMA erfassten Sensorsignale des BISC 02 bereits vor einem Transfer auf einen Messrechner zu analysieren. Zur Verringerung des dafür notwendigen Entwicklungs- und Kostenaufwandes wurde ebenfalls frühzeitig eine Kooperation mit einem regionalen Industriepartner angestrebt [326]. Schließlich musste auch diese Entwicklungsarbeit selbstständig unter Nutzung von *Evaluationboards* durchgeführt werden. Ein FPGA vom Typ Virtex-II der Firma *Xilinx* [327] bildet das Kernstück dieses Prototypen. Das FPGA kann in diesem Modul um einen DSP der Firma *Texas Instruments* ergänzt werden [328, 329]. Die USB (*Universal Serial Bus*)- und I²C-Kommunikation zwischen PC und Sensor wird mittels eines USB-Moduls realisiert [330], welches ebenfalls durch das FPGA angesteuert wird. Diese Komponenten werden mit einer *Interface*-Platine an den NMA angeschlossen [331], siehe auch Anhang B.

5.3 Software-Konzept und Abläufe

Mit dem Modul zur digitalen Signalvorverarbeitung kann der Messrechner hinsichtlich der digitalen Signalauswertung entlastet werden. Die Zwischenspeicherung, die Vorverarbeitung und der Transfer der Messdaten werden auf dem FPGA realisiert bzw. vorbereitet. Auf dem DSP können zusätzliche Algorithmen implementiert werden. Ein mit dem FPGA verbundenes USB-Modul ermöglicht den Datentransfer auf einen Computer [315]. In Abbildung B.1 ist der Gesamtaufbau des entworfenen Systems bestehend aus Neurosensor, NMA (Neuromessadapter) sowie FPGA-, DSP- und USB-Modul zu sehen. Mittels USB-Modul und der darin integrierten I²C-Schnittstelle können das FPGA und der Sensorchip über einen PC konfiguriert werden. Nach dieser Konfiguration können die Messdaten der MEA-Elektroden erfasst, digitalisiert und schließlich analysiert werden. Prinzipiell können diese Daten entweder permanent aufgezeichnet oder nur Abschnitte mit neuronaler Aktivität auf einen Computer transferiert und gespeichert werden.

5.3.1 FPGA Programmierung

Es wird ein *Virtex-IITM V2MB1000 Development Board* der Firma *Memec Design*, jetzt *AVNET Electronics Marketing*, Phoenix, USA, verwendet, welches zur Zwischenspeicherung, Vorverarbeitung und zum Transfer der Sensormessdaten des BISC 02 genutzt wird [327]. Der Datenaustausch zwischen Neuromessadapter und Virtex-FPGA, die Konfiguration des FPGA mittels I²C und die USB 2.0-Kommunikation wird durch eine spezielle *Interface*-Platine ermöglicht, welche die einzelnen Module miteinander verbindet [331]. Das *FPGA-Development Board* stellt einen externen 100 MHz Takt zur Verfügung, der auf dem FPGA intern in einen 48 MHz und einen 24 MHz Takt geteilt wird. Der 48 MHz Takt wird für die *Wavelet*-Transformation und die digitale Filterung der Messdaten auf dem FPGA benötigt. Dagegen wird der 24 MHz Takt zur Datenerfassung, zur *Spike*-Detektion und zur Zwischenspeicherung der Messdaten für den USB-Transfer genutzt [332].

Darüber hinaus wird der 24 MHz Takt auch für die Ansteuerung der AD-Wandler des Neuro-messadapters und für die Taktung des USB-Transfers eingesetzt [332]. Ein *USB High Speed Interface Modul 2.5* der Firma *Braintechology* realisiert die eigentliche USB-Verbindung. Das Herzstück dieses USB-Moduls bildet der Chip CY7C68013 der Firma Cypress. Bei einer externen Taktung dieses Bausteins mit 24 MHz können die Messdaten mit einer *Burst*-Datenrate von 48 MByte/s auf den PC übertragen werden [333]. Das USB-Modul gestattet auch eine I²C-Kommunikation zwischen PC und Messsystem, welche mit einer Taktrate von bis zu 400 kHz ausgeführt werden. Die I²C-Konfiguration des Sensorchips umfasst unterschiedliche Betriebsarten, variable Signalwege, verschiedene Verstärkungen, Variationen der *Bias*-Einstellungen und der Signalausgabe sowie eine *Offset*-Kompensation.

5.3.1.1 Streaming Modus

Diese Betriebsart ermöglicht die kontinuierliche Erfassung von Messsignalen des neuronalen Sensorchips. Alle Daten werden gepuffert und für den Datentransfer per USB 2.0 vorbereitet. Diese Daten werden als Block an das USB-Modul übergeben und anschließend auf den PC übertragen. Aufgrund der relativ hohen Datenrate des Sensors, die bereits bei einer Abtastrate pro Sensorelektrode von 20 kHz insgesamt etwa $2,44 \text{ MByte/s}$ beträgt, müssen bei Langzeitmessungen relativ große Datenmengen bewältigt werden, vergleiche auch die Tabellen 5.6 und 5.7. Dieser Datendurchsatz kann deshalb die Archivierung und besonders die effektive Auswertung eines Experimentes erschweren.

AD-Auflösung/Bit	12	14	16 (<i>Int</i>)
Daten pro MEA-Elektrode / $\frac{\text{Bit}}{\text{s}}$	240.000	280.000	320.000
Daten pro MEA-Elektrode / $\frac{\text{Byte}}{\text{s}}$	30.000	35.000	40.000
Daten pro MEA / $\frac{\text{Byte}}{\text{s}}$	1.920.000	2.240.000	2.560.000
Daten pro MEA / $\frac{\text{MByte}}{\text{s}}$	1,83	2,14	2,44

Tabelle 5.6: Datenraten bei kontinuierlichem Transfer und einer Abtastrate von 20 kHz

AD-Auflösung/Bit	12	14	16 (<i>Int</i>)
Daten pro MEA-Elektrode / $\frac{\text{Bit}}{\text{s}}$	399.600	466.200	532.800
Daten pro MEA-Elektrode / $\frac{\text{Byte}}{\text{s}}$	49.950	58.275	66.600
Daten pro MEA / $\frac{\text{Byte}}{\text{s}}$	3.196.800	3.729.600	4.262.400
Daten pro MEA / $\frac{\text{MByte}}{\text{s}}$	3,05	3,56	4,06

Tabelle 5.7: Datenraten bei kontinuierlichem Transfer und einer Abtastrate von 33,3 kHz

Die realisierte VHDL-Implementierung auf dem FPGA-Modul stellt die für das System erforderlichen Takte zur Verfügung, steuert die Multiplexer des Sensorchips BISC 02 und die

acht AD-Wandler des Neuromessadapters an, realisiert eine Zwischenspeicherung der standardmäßig 14 Bit breiten Abtastwerte und überträgt diese Daten direkt an das USB-Modul. Wie im Abschnitt 5.3.1.2 dargestellt, erfolgt bei einer *Spike*-Detektion zusätzlich noch eine Signalzerlegung mittels diskreter *Wavelet*-Transformation. Nach einer optionalen Filterung und Signalrekonstruktion erfolgt anschließend die Detektion von Aktionspotentialen.

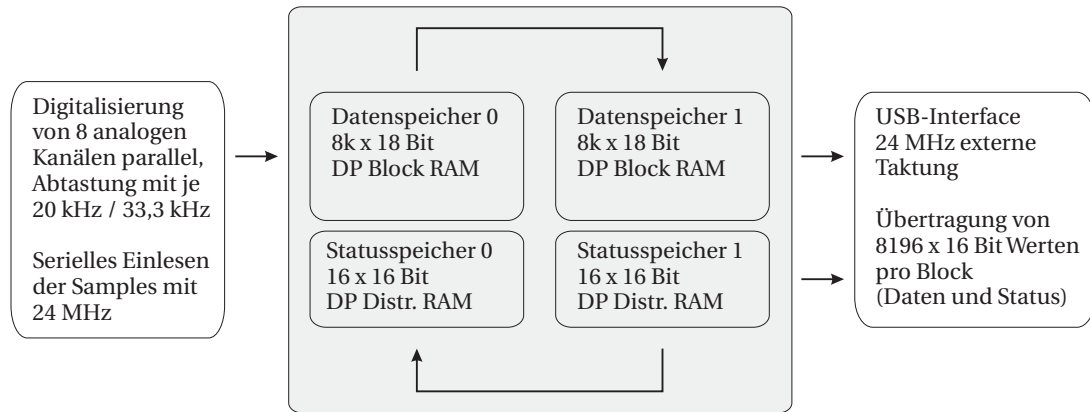


Abbildung 5.24: Prinzip des *Streaming*-Modus parallel für acht MEA-Elektroden nach [7]

Auf dem Sensorchip BISC 02 befinden sich acht analoge Multiplexer, die zu jedem Zeitpunkt je ein Signal der insgesamt 64 MEA-Elektroden ausgeben. Alle acht Multiplexer werden auf dem Sensorchip über einen externen, vom FPGA bereitgestellten Takt angesteuert. Dieser Takt hängt von der gewünschten Abtastfrequenz der Sensorsignale ab. Bei einer Abtastfrequenz von 20 kHz erfolgt eine MUX-Ansteuerung mit einem Takt von 160 kHz. Dieser Takt erhöht sich auf 267 kHz, falls mit 33,3 kHz abgetastet wird. Vor Beginn jeder Messung wird eine Synchronisation zwischen Sensorchip und FPGA durchgeführt, um eine eindeutige Datenzuordnung zu gewährleisten. Das Einlesen der durch die AD-Wandler digitalisierten Werte erfolgt seriell mit 24 MHz auf acht Kanälen gleichzeitig.

Die standardmäßig 14 Bit breiten Abtastwerte werden auf dem FPGA in einem 18 Bit breiten Speicher abgelegt. Bei der Datenerfassung werden in einem Zyklus insgesamt 8192 Werte, also 128 *Samples* für jede der 64 MEA-Elektroden, abgelegt. Zusätzlich werden Zeitmarken und Blocknummern in einem Statusspeicher gesichert. Mit diesen Zusatzinformationen werden je Zyklus 8196 jeweils 16 Bit breite Werte im *Streaming*-Modus ohne Filterung und Detektion direkt zum USB-Modul transferiert und auf den Arbeitsrechner übertragen. Für die Zwischenspeicherung der Messdaten werden auf dem FPGA zwei Speicherbereiche genutzt, die wechselseitig das Einlesen der Daten bzw. deren Übertragung ermöglichen [7, 332]. Die Funktionsweise des *Streaming*-Modus ist in Abbildung 5.24 dargestellt.

5.3.1.2 *Spike*-Detektion

In dieser Betriebsart erfolgt auf dem FPGA-Modul zusätzlich eine Datenvorverarbeitung, die aus einer mehrstufigen Signalzerlegung mit anschließender Filterung und Signaldetektion besteht. Diese Datenanalyse ermöglicht eine deutlich Reduzierung der benötigten

Bandbreite des USB-Transfers, da nur noch detektierte Aktionspotentiale auf dem Messrechner gespeichert werden. Neben der speichereffizienten Archivierung kann so auch die Datenauswertung vereinfacht werden. Es werden wieder 8192 Werte, also 128 Abtastungen für jede der 64 MEA-Elektroden, in einen 18 Bit breiten Speicher eingelesen, da diese Speicherbreite in der Virtex-Architektur bezüglich der FPGA-Multiplizierer optimiert ist.

Nach Abschluss des Einleseprozesses erfolgt die Zerlegung der Messsignale mittels diskreter *Wavelet*-Transformation entsprechend [334]. Die jeweiligen Ergebnisse werden als 18 Bit Integerwerte im Zweierkomplement abgelegt. Mittels Detailband d1 dieser Transformation wird der Rauschpegel des Signals und damit die Höhe der benötigten Detektionsschwelle berechnet. Anschließend erfolgt die Kalkulation der inversen *Wavelet*-Transformation. Das resultierende Zeitsignal wird unter Verwendung der zuvor ermittelten und in einem Schwellwertspeicher abgelegten Detektionsschwelle auf *Spikes* untersucht. Dieses Verfahren wird in Abschnitt 6.1 näher vorgestellt.

Während der Detektion von Aktionspotentialen wird auf dem FPGA ein 160 x 16 Bit breiter Arbeitsspeicher genutzt. Zudem werden die letzten 2048 Werte des vorherigen Datenfensters in einem *History*-Speicher abgelegt, um auch *Spikes* erfassen zu können, die bereits vor Beginn des aktuell untersuchten Datenfensters starteten. Im Falle einer Detektion werden insgesamt 32 Abtastwerte aus dem Messsignal extrahiert, acht *Samples* vor der Über- bzw. Unterschreitung der Schwelle und 24 nachfolgende Abtastwerte. Diese Werte werden als *Spike* inklusive Zeitstempel, Kanalnummer und Rauschniveau in einen FIFO (*First In First Out*)-Speicher des FPGA für den späteren USB-Transfer geschrieben. Das Prinzip des *Spike*-Modus wird in Abbildung 5.25 veranschaulicht.

Eine *Spike*-Detektion ohne *Wavelet*-Zerlegung ist ebenfalls möglich. Hier käme dann eine vorgegebene feste Detektionsschwelle zum Einsatz. Der FIFO-Speicher ist für insgesamt 55 *Spikes* inklusive ihrer Zusatzinformationen ausgelegt. Diese *Spikes* müssen zunächst ausgelesen und mittels USB übertragen werden, bevor neue Signalformen erfasst werden können. Ab sechs im FIFO enthaltenen *Spikes* erhält das USB-Modul das Signal zum Beginn des Datentransfers. Zur Ermöglichung eines Testregimes ohne angeschlossenem Sensorchip existiert ein Testmuster-generator auf dem FPGA, der im entsprechenden Betriebsmodus anstatt der AD-Werte des MEA-Sensors definierte Kurvenformen bereitstellt. Diese eindeutigen Muster können unabhängig von biologischen Messungen zum Systemtest genutzt werden [8, 332, 335, 336].

5.3.2 Datenerfassung auf Messrechner

Praktisch werden alle aktuellen Computer mit einer vorinstallierten *Windows*-Version und USB-Schnittstellen ausgeliefert. Der aktuelle Standard USB 2.0 bietet mit einer möglichen Datenrate von 480 MBit/s, also 60 MByte/s, eine für den neuronalen Sensorchip ausreichend große Bandbreite für die Datenübertragung. Eine Verwendung z. B. des alternativen *Firewire*-Protokolls erfordert dagegen eine zusätzliche Installation von *Hardware*. Vor dem Hintergrund einer möglichst einfachen Installation und Nutzung des Messsystems wurde

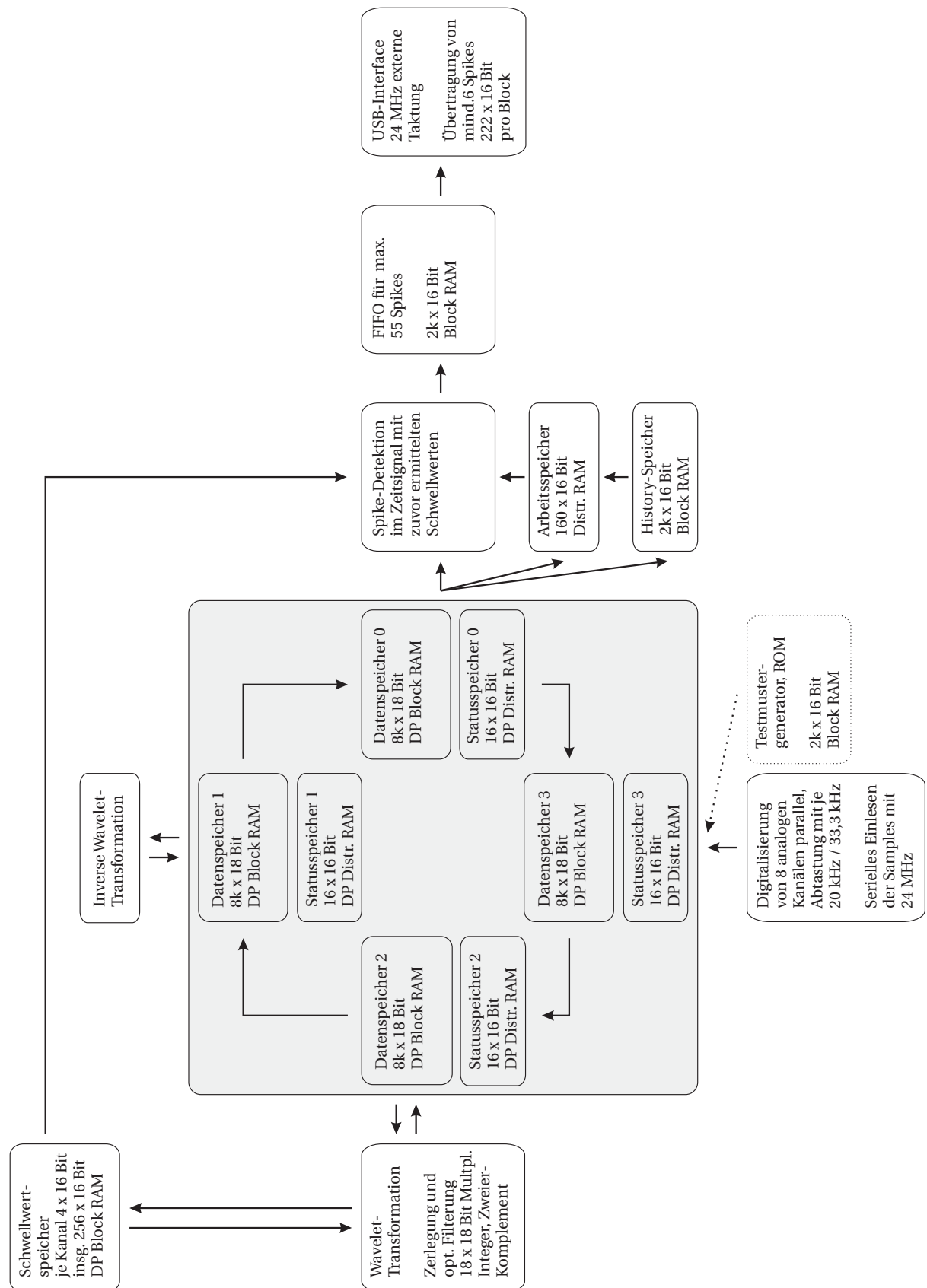


Abbildung 5.25: Prinzip des Spike-Modus parallel für acht MEA-Elektroden nach [8]

das *Windows*-Betriebssystem und USB 2.0 zur Ansteuerung und zum Auslesen des neuronalen Messsystems ausgewählt. Das in Abschnitt 5.3.1 vorgestellte USB-Modul wird über eine DLL (*Dynamic Link Library*) in dieses System mit eingebunden [337].

Das Datenaufkommen pro Sensorchip kann für die 64 MEA-Elektroden je nach Abtastrate und Auflösung bis zu $4,06 \text{ MByte/s}$ betragen, siehe auch die Tabellen 5.6 und 5.7. Dies entspricht bis zu 244 MByte/min . Prinzipiell kann der neuronale Sensorchip deshalb in zwei unterschiedlichen Betriebsmodi betrieben werden. Unabhängig von den konkreten Chipkonfiguration können die erfassten Sensordaten kontinuierlich bzw. ausschnittsweise gespeichert werden, vergleiche dazu auch die Abschnitte 5.3.1.1 und 5.3.1.2. Für die Messungen wurde aufbauend auf [338] eine PC-*Software* entwickelt und zur Konfiguration des Messsystems sowie zur Speicherung der Sensordaten eingesetzt.

Aus Kompatibilitätsgründen werden die Messungen des BISC 02 im *Plexon*-Format gespeichert. So können die Messdaten mit bereits bestehenden Systemen verglichen und entsprechende, frei verfügbare Analysewerkzeuge genutzt werden. Die Dateiformate von *Plexon Inc.*, USA, sind gut dokumentiert und können relativ einfach umgesetzt werden [339]. Im *Continuously Digitized Data*-Format werden die kontinuierlich im *Streaming*-Modus erfassten Messdaten abgelegt. Nach einem *Header* werden die Abtastwerte je Sensorkanal fortlaufend gespeichert. Im so genannten PLX-Format werden dagegen nur einzelne Aktionspotentiale archiviert. Da lediglich Phasen neuronaler Aktivität gespeichert werden, kann die Dateigröße deutlich reduziert werden. Zu den einzelnen *Spikes* selbst werden dann zusätzliche Informationen in entsprechenden *Header*-Strukturen gesichert.

5.3.2.1 *Streaming* Modus

Das C/C++ -Programm *Bisc Recorder* wurde entworfen, um neben der eigentlichen Messdatenarchivierung auch das FPGA und den Sensorchip konfigurieren zu können, da beide Komponenten über den I²C-Bus für verschiedene Betriebsarten initialisiert werden können. Wie in Abbildung 5.26 veranschaulicht, wird mit dieser *Software* zu Beginn einer jeden Messung im *Streaming*-Modus eine Initialisierung des Systems vorgenommen. Dies betrifft zunächst die USB- und die I²C-Kommunikation. Anschließend wird der Sensorchip konfiguriert und eine entsprechende Einstellung in das FPGA geladen. Für die nachfolgende Messung wird zudem ausreichend Speicher für die Datenverarbeitung auf dem Messrechner reserviert.

Danach wird eine automatische *Offset*-Kompensation aller 64 Sensorkanäle des Multielektrodenarrays durchgeführt. Falls erforderlich erfolgt auch eine Anpassung der Verstärkung. Schließlich wird eine DDT-Datei angelegt in die sämtliche Messdaten abgespeichert werden. Eine Synchronisation der Einstellungen von FPGA und Sensorchip gewährleistet die eindeutige Zuordnung der über die Multiplexer des Sensors ausgegebenen Daten. Im Anschluss findet die eigentliche kontinuierliche Erfassung und Archivierung der Sensordaten statt. Wie in Abschnitt 5.3.1.1 erläutert werden die Sensordaten fortlaufend Block-weise per USB 2.0 übertragen, auf dem PC in das DDT-Format konvertiert und abgespeichert.

Nach Abbruch der Datenakquise wird diese DDT-Datei geschlossen. Der Neurosensor und das FPGA-Modul werden zurückgesetzt und der bislang durch den *BISC Recorder* genutzte Speicher wird freigegeben. Die automatische *Offset*-Kompensation wie auch die kontinuierliche Datenspeicherung wurden als *Threads* implementiert, die allerdings nacheinander ausgeführt werden. Einmal konnte so die Priorität der Programmausführung detailliert gesteuert werden. Zudem besteht für den Anwender die Möglichkeit, bei einer zukünftigen Programmiererweiterung auch während einer laufenden Sensormessung mit dem *BISC Recorder* zu arbeiten. Die *Thread*-Realisierung orientierte sich dabei an [340].

5.3.2.2 Spike Modus

Der *BISC Recorder* kommt auch bei der Erfassung der *Spike*-Daten wie in Abbildung 5.27 dargelegt zur Anwendung. Analog zum *Streaming*-Modus erfolgt auch zu Beginn einer *Spike*-Messung die Initialisierung des Messsystems. Erneut wird der erforderliche Speicher für das Programm reserviert. Für diesen Betriebsmodus werden die *Offset*- und Verstärkereinstellungen der kontinuierlichen Messung übernommen. Nach dem Anlegen einer PLX-Datei und der erforderlichen Synchronisation zwischen Sensor und FPGA wird die eigentliche Datenerfassung gestartet.

Es werden jeweils wie in Abschnitt 5.3.1.2 beschrieben sechs *Spikes* mit ihren Zusatzinformationen vom USB-Modul übernommen, anschließend auf dem PC in das PLX-Format konvertiert und abgespeichert. Zusätzlich können diese Daten bei Bedarf auch als binäre Rohdaten für *Debug*-Zwecke in einer separaten Datei gesichert werden. Nach Abbruch der Datenakquise werden die Datenspeicherung abgeschlossen und der Sensor sowie das FPGA-Modul zurückgesetzt. Falls zuvor ausgewählt, werden die binären Rohdaten dann zusätzlich auch als lesbare ASCII (*American Standard Code for Information Interchange*)-*Spike*-Datensätze abgelegt. Die Datenerfassung und nachfolgende Binärdatenkonvertierung wurden ebenfalls in eigenen *Threads* gemäß [340] implementiert.

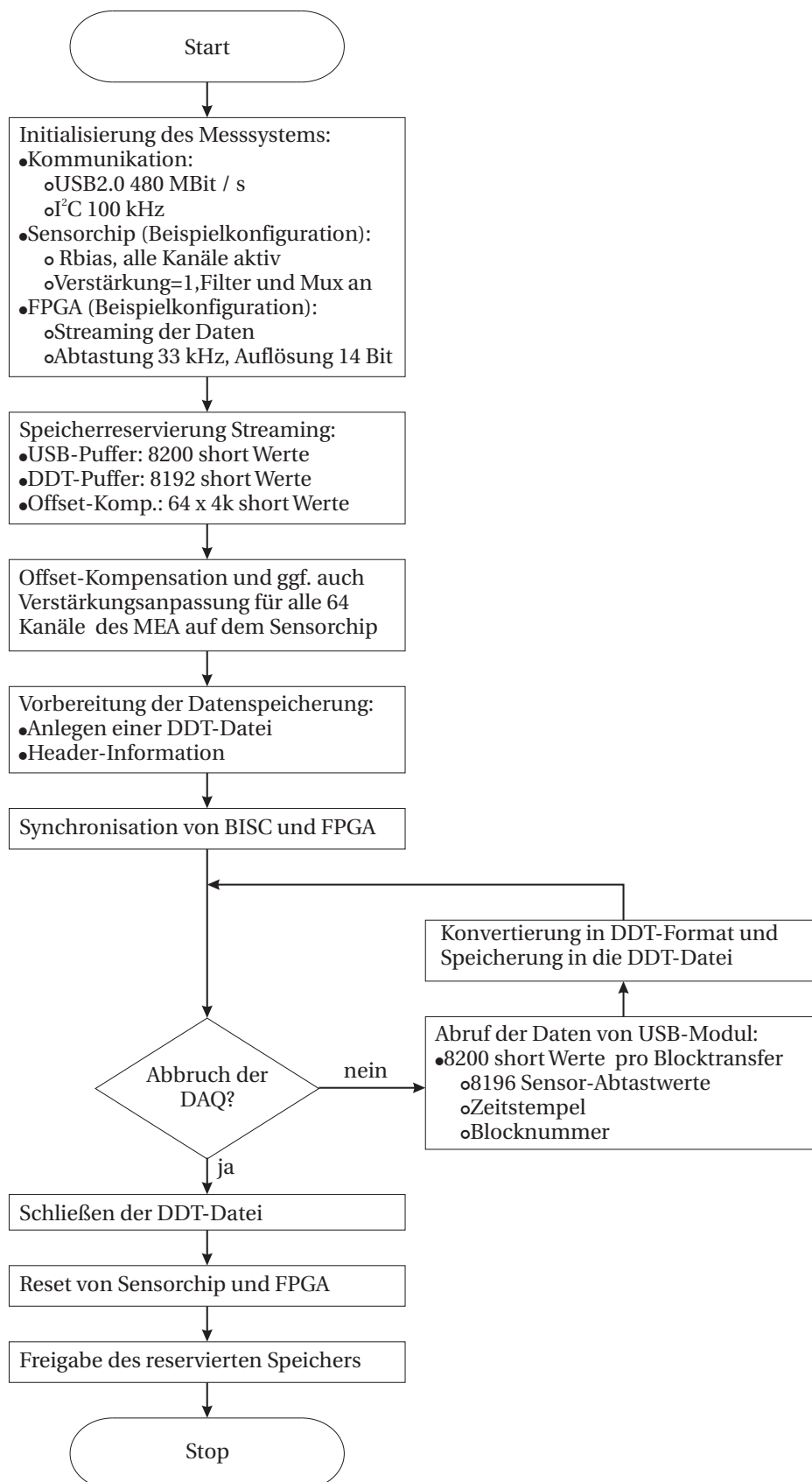


Abbildung 5.26: Konfiguration des Messsystems und Datenarchivierung im *Streaming*-Modus mit Hilfe des *Bisc Recorder Rev. 29*

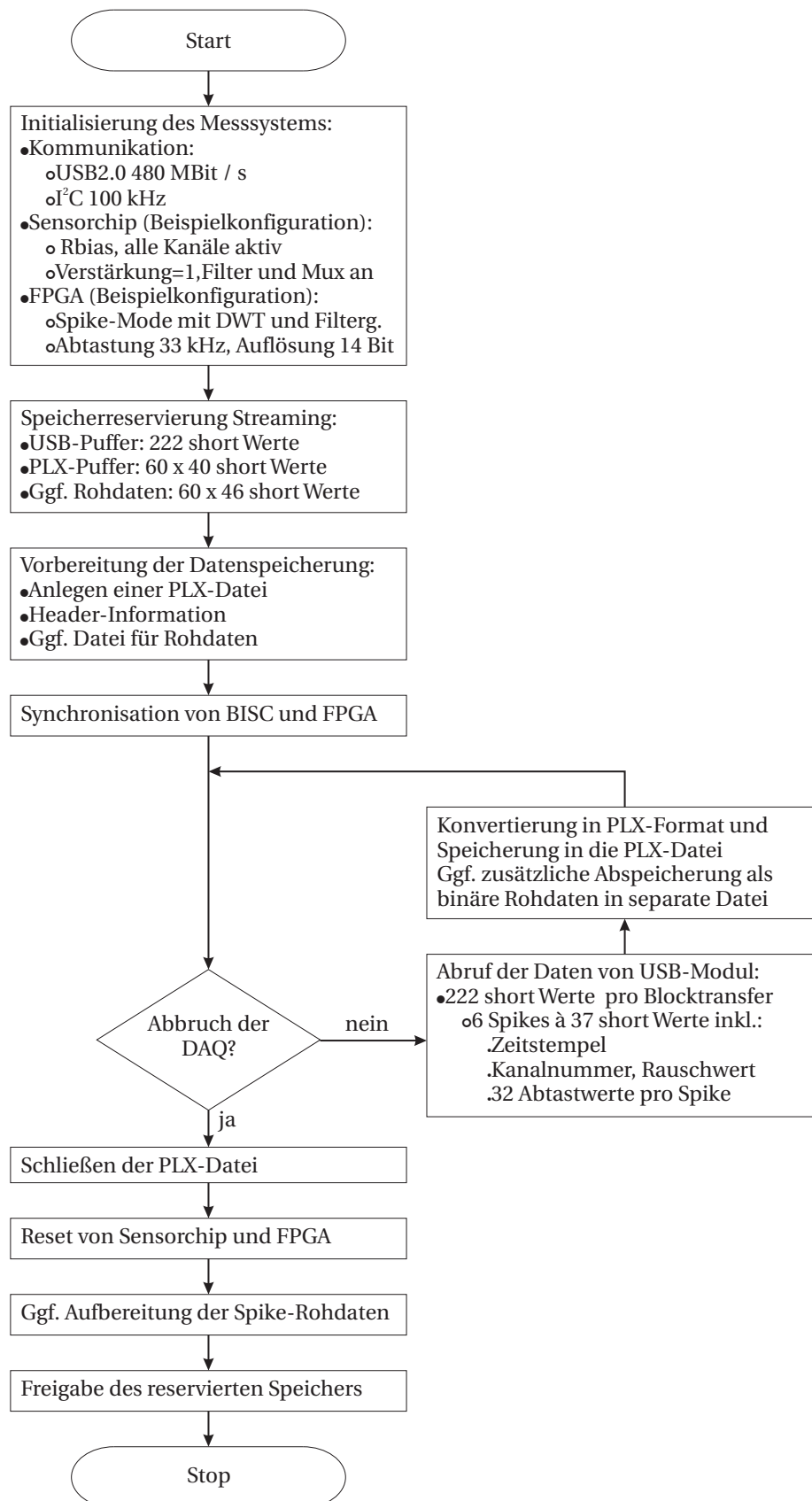


Abbildung 5.27: Konfiguration des Messsystems und Datenarchivierung im *Spike*-Modus mit Hilfe des *Bisc Recorder* Rev. 29

6 Digitale Signalverarbeitung

Die automatisierte Aufbereitung und die Detektion von Sensorsignalen stellen die Grundlagen für die effiziente Anwendung des vorgestellten Messsystems dar. Unter Verwendung der *Wavelet*-Transformation wird das MEA-Signal mehrstufig zerlegt und anhand der Koeffizienten optional gefiltert. Das rekonstruierte Zeitsignal kann nun auf Besonderheiten des Signalverlaufs hin untersucht werden. Basierend auf einer adaptiven Detektionsschwelle ist es möglich, Aktionspotentiale aus einem kontinuierlichen neuronalen Messsignal zu extrahieren. Neben der automatisierten Detektion von Aktionspotentialen ist eine weitgehend autonome Klassifikation der Sensordaten wünschenswert.

Das Ziel ist die Zuordnung der extrahierten Aktionspotentiale zu bestimmten Neuronen der Zellkultur. Diese zeitliche und räumliche Zuordnung ermöglicht eine genauere Beschreibung des Netzwerkverhaltens. Da die Neuronen im Allgemeinen nicht lokalisiert werden können, wird diese Zuordnung oftmals auch als *Unit-Separation* bezeichnet. Grundsätzlich wird die Klassifizierung dadurch erschwert, dass weder das Aussehen dieser *Spikes* noch die Anzahl der zu erwartenden Klassen vor einer Messung bekannt sind. Die Klassifizierung kann also nur auf den Messdaten selbst basieren. Wie im Abschnitt 3.1.2 dargelegt stellt der Mangel an effektiven, möglichst nicht überwachten Verfahren der Klassifikation eine wichtige Einschränkung bei der Nutzung von MEA-Systemen dar.

In den Abschnitten 3.2 und 3.3.3 wurden bereits zahlreiche Ansätze zur Klassifikation von Aktionspotentialen mit ihren Vor- und Nachteilen vorgestellt. Im Rahmen dieser Arbeit stand deshalb auch nicht die Suche nach neuen Klassifikationsverfahren im Vordergrund. Jedoch wurde das Ziel einer zügigen Implementierung bekannter, einfacher aber robuster Methoden der Datenauswertung verfolgt. Diese Verfahren sollten in der Lage sein, den Umfang der manuellen Interaktion während einer idealerweise in Echtzeit durchgeführten Klassifikation der Sensordaten zu reduzieren. Es wurde dabei auf bewährte *Template Matching*-Verfahren zurückgegriffen.

Zusätzlich wurden verschiedene Methoden der Merkmalsgewinnung sowie alternative Merkmalsvektoren hinsichtlich ihrer Eignung für die Mustererkennung untersucht. Die robuste Identifikation der vorhandenen Klassen stellt dabei ein Problem dar. Erst mit dem Vorliegen dieser Modell-*Spikes* oder *Templates* kann aber die eigentliche Klassifikation beginnen. Durch das Fehlen einer objektiven *Unit*-Definition kann die Bewertung der entstandenen Klassen selbst durch Experten sehr unterschiedlich ausfallen. In den nachfolgenden Abschnitten erfolgt zunächst eine Darstellung der angewendeten Signalfilterung und der *Spike*-Detektion. Neben Ansätzen zur *Template*-Generation wird dann auch ein Klassifikationsverfahren vorgestellt.

6.1 Signalaufbereitung und Detektion

6.1.1 Hintergrund

Im Abschnitt 3.2.1 erfolgte bereits eine Darstellung prinzipieller Ansätze zur Extrahierung von Aktionspotentialen. Demnach lassen sich Extraktionsmethoden unter Verwendung von Detektionsschwellen zwar relativ einfach implementieren. Die Wahl der optimalen Schwellenhöhe zur bestmöglichen Trennung von neuronaler Aktivität und Rauschen kann bei diesem traditionellen Ansatz aber problematisch sein. Die Detektion mittels Schwellen eignet sich jedoch aufgrund ihrer Einfachheit besonders für eine Echtzeimplementierung.

Die *Wavelet*-Transformation kann die Energie des Sensorsignals nicht nur in unterschiedlichen Zeit- bzw. Frequenzauflösungen darstellen. Die Manipulation der *Wavelet*-Koeffizienten kann auch zur effektiven Signalfilterung eingesetzt werden, u. a. [341–344]. Diese Filterung, oftmals auch *Denoising* und *Detrending* genannt, kann den Signalausgang des untersuchten Messsignals verbessern und somit das Ergebnis der *Spike*-Detektion mittels Schwellenansatz optimieren. Deshalb soll die Signalaufbereitung mittels *Wavelet*-Transformation und die anschließende *Spike*-Detektion anhand einer adaptiven Schwelle untersucht werden.

Die Signalfilterung unter Anwendung einer nichtlinearen Schwellenoperation zur Modifizierung von *Wavelet*-Koeffizienten wurde erstmals in [345] vorgestellt. Dieses Verfahren zur Rauschreduzierung untersucht die gesamte Bandbreite des Signals. Diese als *Wavelet Shrinkage* bezeichnete Methode benötigt keine Annahmen bezüglich des Charakters des zu untersuchenden Signals und erlaubt Signalunstetigkeiten. Aufgrund der Orthogonalität dieser Transformation wird das weiße Rauschen des Ausgangssignals wieder in weißes Rauschen der gewonnenen Koeffizienten transformiert. Lediglich die Signalenergie wird in Abhängigkeit der gewählten *Wavelet*-Familie in weniger Koeffizienten konzentriert. Daher ist eine Trennung von Signal und Rauschen möglich [345, 346].

$$X(t) = S(t) + N(t) \quad (6.1)$$

$$\mathfrak{W}_X[m, n] = 2^{-\frac{m}{2}} \sum_k X[k] \psi(2^{-m}k - n) \quad (6.2)$$

Dieser Filteransatz arbeitet in Bezug auf die Abschätzung der Stetigkeit des untersuchten Signals nahezu optimal. Die Methode umfasst drei Schritte, siehe Gleichungen 6.3 bis 6.5. Ausgehend von realen Messdaten $X(t)$, siehe Gleichung 6.1, soll das wahre Signal $S(t)$ unter Annahme eines additiven, Gauß-verteiltern weißen Rauschens $N(t)$ abgeschätzt werden. Nach der Digitalisierung des Messsignals kann eine diskrete *Wavelet*-Transformation \mathfrak{W}_X gemäß Gleichung 6.2 der Daten $X[k]$ berechnet werden. Anschließend wird eine Schwelle λ auf die *Wavelet*-Koeffizienten Y angewendet. Die Rücktransformation \mathfrak{W}_X^{-1} liefert eine Abschätzung des diskreten Signals $\hat{S}[k]$. Nach einer DA-Wandlung liegt dann $\hat{S}(t)$ vor [346].

Die Gleichung 6.6 beschreibt eine nichtlineare Operation D , bei der die Schwelle λ auf die *Wavelet*-Koeffizienten angewendet wird. Es handelt sich hier um *Soft Thresholding*. Die Wahl der Schwelle λ ist von entscheidender Bedeutung für das *Shrinkage*-Verfahren. In diesem Falle muss das Verfahren gemäß den Gleichungen 6.3 bis 6.5 um einen vierten Schritt zur adaptiven Abschätzung von λ ergänzt werden. Deshalb existieren zahlreiche Varianten des *Wavelet Shrinkage Denoising*, die sich in der Implementierung der *Wavelet*-Transformation und in der Wahl und Anwendung der Schwelle unterscheiden [346–348].

$$Y = \mathfrak{W}(X) \quad (6.3)$$

$$Z = D(Y, \lambda) \quad (6.4)$$

$$\hat{S} = \mathfrak{W}^{-1}(Z) \quad (6.5)$$

Bemerkenswert ist ein *Denoising*-Ansatz, welcher unter der Annahme von weißem, Gauß-verteilterm Rauschen auf einer universellen Schwelle basiert, die datenunabhängig berechnet wird, siehe Gleichung 6.7. Der Schwellwert λ hängt lediglich von der Standardabweichung des Rauschens σ und der Menge n der untersuchten Abtastwerte ab. Diese globale Schwelle wird auf alle Dekompositionsstufen der DWT angewendet [347]. Im Gegensatz zu alternativen Schwellen vereinfacht sich die Berechnung, da die Anzahl n der untersuchten Werte vorab bekannt ist. Speziell in der Bildbearbeitung wird die „visuelle“ Überlegenheit dieser auch als *VisuShrink* bezeichneten Methode hervorgehoben [345, 347, 348].

$$D(Y, \lambda) \equiv \text{sgn}(Y) \max(0, |Y| - \lambda) \quad (6.6)$$

$$\lambda = \sigma \sqrt{2 \log_e(n)} \quad (6.7)$$

$$\hat{\sigma} = \frac{\text{Median}(|Y_{d-1,k}| : 0 \leq k < 2^{d-1})}{0,6745} \quad (6.8)$$

Empirische Untersuchungen zeigen, dass das feinste Detailband $d1$ der *Wavelet*-Dekomposition eines mit weißem Rauschen überlagerten Signals von wenigen Ausnahmen abgesehen auch aus Rauschen besteht. Unter der Annahme der Normalverteilung wird daher zur robusten Abschätzung der Standardabweichung des Rauschens $\hat{\sigma}$ die Gleichung 6.8 auf die Koeffizienten Y in $d1$ angewendet. Das Verfahren *Median Absolute Deviation* eignet sich dabei gut zur Abschätzung von mittelwertlosem, Gauß-verteilterm, weißem Rauschen. Die Schwelle $\hat{\sigma} \sqrt{2 \log_e(n)}$ wird dann auf alle Detailbänder angewendet. Die inverse *Wavelet*-Transformation gestattet danach eine Abschätzung des rauschreduzierten Originalsignals [347, 349]. Dieser universelle Ansatz kann mit geänderter Schwellenberechnung auch bei nicht weißem Rauschen sowie nicht Gauß-verteiltern Daten genutzt werden [348].

6.1.2 Simulation und Implementierung

Neben der analogen, *Hardware*-basierten Filterung bieten sich zusätzliche digitale Filter für die Aufbereitung von MEA-Signalen an. Bei einer Untersuchung von klassischen Verfahren konnten lediglich FIR (*Finite Impulse Response*)-Filter überzeugen. Alternativ einsetzbare IIR (*Infinite Impulse Response*)-Filter weisen bei vergleichbaren Spezifikationen zwar eine kleinere Ordnung und somit einen geringeren Implementierungsaufwand auf. Infolge ihrer nichtlinearen Phasenverläufe kommt es aber zu Signalverzerrungen [334].

Traditionell wird in einer Lernphase die Schwellenhöhe für die *Spike*-Detektion manuell bestimmt und während eines Experimentes unverändert beibehalten, siehe z. B. [139, 266]. In *Offline*-Verfahren erfolgt dagegen die Ermittlung der Detektionsschwelle oftmals in Abhängigkeit der Standardabweichung σ des gesamten Signals. Bei einer Echtzeimplementierung kann die Höhe der Detektionsschwelle nur unter Berücksichtigung eines begrenzten Teils der akquirierten Daten gewählt werden. Sie muss sich zudem in Abhängigkeit der Signaleigenschaft ändern können.

Mit verschiedenen Verfahren kann die Standardabweichung eines Signalausschnitts abgeschätzt und in Abhängigkeit dazu die Schwellenhöhe nachgeführt werden. Wird bei dieser Abschätzung jedoch die gesamte Bandbreite des Messsignals genutzt, so kann z. B. aufgrund von *Burst*-Aktivitäten im neuronalen Signal die Schwellenhöhe deutlich ansteigen und so zu Detektionsfehlern führen [163, 350]. In diesem Zusammenhang kann die *Wavelet*-Transformation angewendet werden, da aufgrund ihrer Mehrfachauflösung neben einer effektiven Signalkonditionierung auch die Bestimmung einer gegenüber dem FIR-Ansatz robusteren Detektionsschwelle ermöglicht wird [334].

Analysen mittels LabVIEW[®] an einem synthetisierten, nicht zusätzlich bandbegrenzten Signal zeigten, dass bereits bei der Verwendung des *Spike*-ähnlichen db2¹-*Wavelets* gegenüber dem Haar-*Wavelet* bei vergleichbarem Implementierungsaufwand eine deutlich verbesserte Trennung von Signal- und Rauschanteilen erzielt werden konnte. Das db4-*Wavelet* erreichte diesbezüglich eine weitere Verbesserung. Die Untersuchungen bestätigten auch, dass das feinste Detailband $d1$ der *Wavelet*-Transformation zur robusten Abschätzung von $\hat{\sigma}$ genutzt werden kann [334].

Aufgrund der weitgehenden Trennung von Signal- und Rauschanteilen mittels DWT und geeignetem *Wavelet* bleibt $\hat{\sigma}$ des Detailbandes $d1$ im Allgemeinen unbeeinflusst von möglicher neuronaler Aktivität. Eine Schwelle zur *Spike*-Detektion kann bei einem nicht bandbegrenzten Signal also an $\hat{\sigma}_{d1}$ gekoppelt und oberhalb des Signalrauschens positioniert werden. Nach einer optionalen Signalfilterung mittels *Thresholding* der *Wavelet*-Koeffizienten laut den Gleichungen 6.6 und 6.7 und der Rücktransformation des Signals kann im untersuchten Datenfenster die *Spike*-Detektion durchgeführt werden [351].

¹Generell werden die *Wavelets* der Daubechies-Familie mit dbN bezeichnet, wobei N der Ordnung des *Wavelet* entspricht. Verschiedene Autoren nutzen jedoch die Bezeichnung 2N.

Dieses Verfahren zur Rauschreduzierung und *Spike*-Detektion wurde zunächst auf einem PCI-Board mit *Xilinx Virtex E* FPGA implementiert und anhand simulierter Sensordaten getestet. Die diskrete *Wavelet*-Transformation wurde dabei unter Verwendung des *Lifting Scheme* [352, 353] in *Handel-C* [354, 355] realisiert. Der Berechnungsaufwand konnte so gegenüber dem FIR-Ansatz deutlich verringert werden. Die Berechnungen wurden mittels Festkomma-Arithmetik ausgeführt und die *Wavelet*-Koeffizienten als Binärbrüche gespeichert. Es kam das db2-*Wavelet* zum Einsatz. Zur Bestimmung des Rauschniveaus im synthetisierten Testsignal wurde das Detailband $d1$ analysiert [356].

$$MD = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n |x_i - \bar{x}| \quad (6.9)$$

$$MD = \sigma \sqrt{\frac{2}{\pi}} \quad (6.10)$$

Zur Vereinfachung der Implementierung wurde $\hat{\sigma}_{d1}$ im Unterschied zu Donoho et al. mittels MD (Mean Absolute Deviation from the Mean) gemäß den Gleichungen 6.9 und 6.10 abgeschätzt. Dabei wurde in guter Näherung $\bar{x} = 0$ angenommen. Man kann zwar zeigen, dass MD als Streuungsmaß zur Beschreibung einer normalverteilten, fehlerbehafteten Messung geeignet ist [357] und deshalb in vergleichbaren Detektionsansätzen auch zur Anwendung kommt [177]. Allerdings kann diese vereinfachte $\hat{\sigma}$ -Abschätzung durch neuronale Signalanteile beeinflusst werden, die zusätzlich im Detailband $d1$ enthalten sein könnten. Der aufwändigere MAD-Schätzer liefert eine robustere Schätzung der Standardabweichung, da der Median weniger anfällig für möglichen „Ausreißer“ ist [358].

Die auf dem *Virtex E* umgesetzte Signalkonditionierung beschränkt sich auf eine optionale Hochpassfilterung mit Löschung des $\alpha 5$ -Bandes. Diese Filterung entspricht bei $F_S = 20$ kHz einer Grenzfrequenz von ca. 312,5 kHz. Es wird jeweils ein Fenster von 128 Werten pro Kanal mit der DWT in fünf Skalen zerlegt. Für die *Denoising*-Schwelle würde gemäß Gleichung 6.7 deshalb $\lambda \approx \hat{\sigma}_{d1} \cdot 3,11$ bzw. $\lambda \approx 3,9 \cdot MD$ gelten. $\hat{\sigma}_{d1}$ wird aber nur zur Bestimmung einer Detektionsschwelle für die *Spike*-Extraktion genutzt. Unter der Annahme einer Normalverteilung wird die Größe des Rauschniveaus mit $3 \cdot \hat{\sigma}_{d1}$ bzw. $3,76 \cdot MD$ angesetzt. Die Detektionsschwelle ergibt sich dann als zweifaches Rauschniveau $\text{thr}_{\text{Det}} = 7,52 \cdot MD$. Diese Berechnung kann gerundet über Schiebeoperationen erfolgen [351].

Die Wirksamkeit dieses Ansatzes wurde mit simulierten Daten überprüft und bestätigt. Diese Testdaten wurden anhand von *Spike-Templates*, weißem, Gauß-verteilterm Rauschen und einem niederfrequenten Sinussignal erstellt. Die *Spike*-Detektion in realen Messdaten erforderte dagegen in Abhängigkeit des realen Rauschens eine weitere Anhebung der Detektionsschwelle [334, 359, 360]. Das Verfahren wurde als nächstes auf einen *Xilinx Virtex II* FPGA portiert [327], um den BISC 02 gemäß Abschnitt B.1 anzusprechen. Die Realisierung erfolgte nun in VHDL. Für die Anbindung der FPGA-Plattform an den NMA des Neurosensors wurde ein *Interface* entwickelt, welches auch die optionale Kommunikation mit einem externen DSP (Digitaler Signalprozessor) ermöglicht, siehe auch Abschnitt B.2 [311, 361].

In der aktuellen FPGA-Implementierung kann nun nach der *Wavelet*-Dekomposition eine Filterung durch das Löschen der größten und der feinsten Koeffizienten a_5 bzw. d_1 erfolgen. Im Anschluss an die IDWT (Inverse Diskrete *Wavelet*-Transformation) des zerlegten Signalausschnittes wird die eigentliche Detektion und Extraktion der Aktionspotentiale wieder im Zeitbereich durchgeführt. Ein Aktionspotential wird erkannt, wenn der Absolutwert eines *Sample* oberhalb der Detektionsschwelle und sein Nachfolger nicht unterhalb der Rauschschwelle liegt. Es werden dann unabhängig von der Abtastrate insgesamt 32 Abtastwerte des erkannten *Spike*, acht Werte vor der Schwellenüberschreitung und 23 Nachfolger, extrahiert. Diese Daten werden gemeinsam mit einem *Header* bestehend aus einem Zeit-*Offset*, der Kanalnummer, einem Zeitstempel und dem Rauschwert in einen FIFO abgelegt und per USB 2.0 auf den Messrechner übertragen [332].

6.2 Verfahren zur *Template*-Generation

Die Anzahl möglicher Klassen einer *Unit*-Separation, das Aussehen ihrer *Templates* sowie ihre Distanzen zueinander sind zu Beginn der Messung unbekannt und müssen aus einem begrenzten Datensatz z. B. innerhalb einer Lernphase ermittelt werden. Während des Experimentes gilt es dann die neu detektierten Signalausschnitte den gefundenen Klassen zuzuordnen und diese Klassen falls gewünscht zu aktualisieren. Eine vollständige Automation dieser Verfahren erscheint nur eingeschränkt möglich, da oftmals eine manuelle Interaktion zur Ergebnismessung benötigt wird. Diese Problematik bleibt auch bestehen, wenn der eigentliche Klassifikationsansatz bzw. die untersuchten Merkmalsvektoren geändert werden. Aus diesem Grund erfolgten die Untersuchungen weitgehend in MATLAB[®]. Eine Auflösung möglicher Überlappungen von zeitgleich auftretenden Aktionspotentialen an einer Sensorelektrode ist bei den untersuchten Verfahren nicht vorgesehen.

6.2.1 Dichteuntersuchung im Musterraum

Die traditionelle Auswahl potentieller *Templates* z. B. unter Beachtung ihrer Extrema erweist sich aufgrund der in der Regel erforderlichen manuellen Interaktion für ein automatisiertes Verfahren als ungeeignet. Zudem ist die Anzahl der untersuchten Dimensionen möglicher Mustervektoren bei der visuellen Auswertung der Daten auf meist drei beschränkt. Die Nutzung der Amplitude von Aktionspotentialen als Klassifikationsmerkmal wird durch die Tatsache eingeschränkt, dass dieses nahe liegende Merkmal sich in komplexen *Spike Bursts* zwischen 40 % und 80 % ändern kann und amplitudenbasierte Unterscheidungsmerkmale eine entsprechend große Toleranz bei der Klassifikation besitzen müssten [240, 291, 362]. Nach der Festlegung der Merkmalsvektoren können bei der Suche nach Ansätzen der automatisierten *Template*-Ermittlung auch Verfahren der Clusteranalyse angewendet werden.

K-Means, *K-Median* und zahlreiche weitere Verfahren benötigen allerdings a priori eine Abschätzung der Zahl und der ungefähren Lage der erwarteten Cluster. Ein interessanter Ansatz zur nicht überwachten Abschätzung der Zahl und der Lage der Cluster im beliebig dimensionierten Musterraum wird in [240] vorgestellt. Mittels einer mehrstufigen, statistischen Auswertung der einzelnen Datenpunkte und ihrer Nachbarschaften werden diese in Abhängigkeit der ermittelten Struktur in Cluster eingeordnet. Nach der Zusammenfassung redundanter Cluster und einer Neuordnung der Datenpunkte aufgrund der identifizierten Schwerpunkte des Datensatzes können die gefundenen Clusterzentren an einfach zu implementierende *K-Means*-Algorithmen übergeben werden.

In diesem Zusammenhang könnte auch die nicht parametrische Abschätzung der Dichte im Musterraum nach Gleichung 3.14 genutzt werden. Ein möglicher Ansatz wurde mittels MATLAB[®] in einer verwandten Arbeit unserer Forschungsgruppe simuliert. Nach einer Dimensionsreduzierung der zuvor detektierten Aktionspotentiale mittels Hauptkomponentenanalyse werden die ersten drei dieser Komponenten als Punktwolke dreidimensional dargestellt. Im Anschluss wird diese Punktwolke in Volumina definierter Größe gleichmäßig aufgeteilt, welche dann auf ihre Dichte hin untersucht werden. Die Zentren der Regionen höherer Dichte können potentielle *Templates* bilden, die es zur Ermittlung der globalen Extrema des Musterraums zu bewerten gilt [363, 364].

Vergleichbare Ansätze der *Template*-Generation mittels Dichteuntersuchung anhand der ersten beiden Hauptkomponenten werden in [365, 366] für eine *offline* Klassifikation beschrieben. Problematisch könnte hier allgemein das Auffinden von lokalen anstatt der gewünschten globalen Regionen größerer Dichte sein. Die selbstständige Bestimmung herausragender *Spike*-Merkmale und die gleichzeitige Dimensionsreduzierung mittels Hauptkomponentenanalyse in Kombination mit Verfahren der Dichteuntersuchungen dürften z. B. im Vergleich zu amplitudenbasierten Ansätzen ein größeres Potential in Bezug auf die gewünschte Verfahrensautomatisierung besitzen. Ähnliche Methoden der *Unit*-Separation mittels Clusterung von PCA-Daten werden u. a. auch in [367] dargestellt.

Weitere Ansätze zur *Template*-Generation wurden nicht nur unter MATLAB[®] simuliert sondern auch auf DSPs implementiert [328, 368–370]. Es kamen hierbei zunächst nur Ressourcen schonende, einfache Amplituden- und formbasierte Verfahren zur Anwendung. Angesichts der Unzulänglichkeiten dieser Methoden konzentrierten sich die weiteren Arbeiten zur *Template*-Generation auf die Dichteuntersuchung im Musterraum gemäß [363]. Trotz der Nutzung der umfangreichen Funktionsbibliotheken in MATLAB[®] für diese Auswertung bestand aus Gründen der *Performance* und der Portierbarkeit der Wunsch, diese Verfahren auch in externe C/C++ -Programme einzubinden. Deshalb wurden mittels MATLAB[®] *Compiler 4.0 M-Code* zur Dichteauswertung als *Stand Alone*-Funktion exportiert [371, 372] und zur *offline* Identifizierung von *Templates* genutzt. Bis zum zuverlässigen Einsatz dieser Methodik scheinen weitere Analysen insbesondere zur Bewertung der Relevanz der identifizierten *Templates* notwendig zu sein.

6.2.2 Analyse von Koeffizienten der diskreten *Wavelet*-Transformation

Die digitale Aufbereitung der Messdaten im BISC-Sensorsystem umfasst u. a. eine *Wavelet*-Transformation der MEA-Signale. Für die weitere *Spike*-Extraktion und Klassifizierung wird das Signal allerdings wieder in den Zeitbereich zurück transformiert. Neben der bereits angewendeten Signalfilterung mittels Schwellenvergleich der gewonnenen *Wavelet*-Koeffizienten würde eine weiter gehende Koeffizientenanalyse zur Mustererkennung ohne eine Rücktransformation des Signals nahe liegen. Im Rahmen der Arbeiten an diesem Neuronensensor wurden in einer eigenständigen Arbeit an der HTWK (Hochschule für Technik, Wirtschaft und Kultur) Leipzig deshalb Möglichkeiten untersucht, geeignete *Wavelet*-Koeffizienten und Clusterverfahren für die Klassifikation von Aktionspotentialen zu ermitteln, siehe [373].

$$X(m, n) = 2^{-\frac{m}{2}} \sum_{k=-\infty}^{\infty} x(k) \psi^*(2^{-m}k - n) \quad (6.11)$$

Zunächst kann das abgetastete Aktionspotential $x(k)$ mittels diskreter *Wavelet*-Transformation und eines Mutter-*Wavelet* ψ nach Gleichung 6.11 mehrstufig für eine Multiratenanalyse zerlegt werden. Dabei wird das verwendete Mutter-*Wavelet*, siehe Gleichung 6.12, in unterschiedlich skalierten und verschobenen Versionen mit dem Zeitsignal korreliert, um dessen Zeit- und Frequenzauflösung zu erfassen. Bei Implementierung der DWT werden im unteren Bereich des Frequenzspektrums des zu analysierenden Zeitsignals die Varianten des Mutter-*Wavelet* bis zur Skala m zu einer Skalierungsfunktion ϕ zusammengefasst, siehe Gleichung 6.13, Gleichung 6.14 und Gleichung 6.15. Zudem begrenzt die Filterbankrealisierung der DWT die Anzahl der benötigten Iterationen [374]. Die Wahl des Typs und der Ordnung des verwendeten Mutter-*Wavelet* ist von großer Bedeutung für das Ergebnis der Transformation. Je besser das untersuchte Signal mit einer skalierten und verschobenen Version des Mutter-*Wavelet* übereinstimmt, desto effektiver kann dieses Signal mit wenigen *Wavelet*-Koeffizienten $X(m, n)$ dargestellt werden.

Die Grundlage der in [373] dargelegten Untersuchungen bilden die Veröffentlichungen [194] und [163]. In [194] wird ein so genannter WSC (*Wavelet Spike Classifier*) für die *offline* Klassifikation vorgestellt. Dabei werden zunächst potentielle *Spikes* aus einem neuronalen Messsignal z. B. anhand einer Detektionsschwelle extrahiert und mittels DWT und Mutter-*Wavelets* der Daubechies-Familie zerlegt. Anschließend wird die Streuung der so gewonnenen *Wavelet*-Koeffizienten mit Hilfe der Standardabweichung für alle *Spikes* untersucht, um die Koeffizienten zu identifizieren, die eine bestmögliche Unterscheidung dieser Aktionspotentiale gewährleisten könnten. In einem weiteren Schritt wird eine bestimmte Anzahl geeigneter Koeffizienten ausgewählt, die dann paarweise im zweidimensionalen Raum als Punktwolke dargestellt werden. Die Clusterung der Punktwolken wird in dieser Veröffentlichung manuell vorgenommen. Die Autoren sehen jedoch die Möglichkeit einer *online* Implementation unter Nutzung einer automatisierten Clusterung.

In der Publikation [163] werden mögliche *Spikes* erneut über eine Amplitudenschwelle ermittelt. Nach der Extraktion wird die *Wavelet*-Transformation dieser Aktionspotentiale unter Nutzung eines Haar-Mutter-*Wavelet* berechnet. Mit Hilfe des KS (Kolmogorov-Smirnov)-Tests wird dann eine kleine Anzahl von Koeffizienten für die anschließende, nicht überwachte, super-paramagnetische Clusterung, auch SPC, ausgesucht und eine Klassifizierung der Aktionspotentiale vorgenommen. In [373] werden nun die Standardabweichung sowie der KS-Test genutzt, um geeignete *Wavelet*-Koeffizienten für eine Clusterung zu identifizieren. Anschließend erfolgt eine Bewertung der Verfahren *K-Means*, *Growing K-Means* und SPC bezüglich ihrer Eignung zur Clusterung der vorher ausgewählten Koeffizienten. Die Implementierung dieser Algorithmen und die Auswertung der erzielten Ergebnisse erfolgen mittels MATLAB®.

$$\psi_{m,n}(k) = 2^{-\frac{m}{2}} \psi(2^{-m}k - n) \quad (6.12)$$

$$\phi_{m,n}(k) = 2^{-\frac{m}{2}} \phi(2^{-m}k - n) \quad (6.13)$$

$$\phi(k) = \sum_{m,n} d(m,n) \psi_{m,n}(k) \quad (6.14)$$

Bei der Auswahl geeigneter *Wavelet*-Koeffizienten für eine Clusterung können mittels der *offline* berechneten Standardabweichung und dem *online* implementierten KS-Test vergleichbare Ergebnisse erzielt werden. Die manuelle Clusterung des Datensatzes unter Verwendung der ersten drei Hauptkomponenten dient in Bezug auf die Auswertung der untersuchten Clusterverfahren als Referenz. Es zeigt sich, dass die Wahl der Ordnung der verwendeten Daubechies-Mutter-*Wavelets* wie erwartet Auswirkungen auf die Separierbarkeit der entstehenden Cluster hat. Das einfach zu implementierenden *K-Means*-Verfahren weist bei der Clusterung der Koeffizienten die bekannten Probleme auf, wenn die genaue Clusterzahl vorab nicht bekannt ist und überlappende sowie nicht sphärische Cluster auftreten. Die Methode *Growing K-Means* stellt eine Erweiterung des klassischen *K-Means*-Ansatzes dar. Sie ist besser für die nicht überwachte Clusterung geeignet, da mittels Schwellenvergleich und Lernfaktor adaptiv neue Cluster angelegt werden können. Auch hier können Probleme bei der Clusterung von sich überlappenden Clustern entstehen.

$$x(k) = \sum_n a_m[n] \phi_{m,n}(k) + \sum_{l=m}^{-\infty} \sum_n d_l[n] \psi_{l,n}(k) \quad (6.15)$$

Der für das SPC genutzte Algorithmus basiert auf [375, 376] und wurde von diesen Autoren in kompilierter Form für die Untersuchung zur Verfügung gestellt. Mit diesem nicht überwachten Verfahren konnten die von den Autoren mitgelieferten Datensätzen erfolgreich in Cluster eingeteilt werden. Allerdings war es aufgrund einer problematischen *Spike*-Erkennung nicht möglich, diese Methode auch auf andere neuronale Daten anzuwenden [373].

Dennoch dürfte dieses Verfahren gegenüber *K-Means* und *Growing K-Means* bei einer korrekten Implementierung bessere Ergebnisse erzielen, da die Clusterzahl vorab nicht benötigt wird und auch rauschbehaftete Daten klassifiziert werden können. Die entstehenden Cluster können zudem auf ihre Stabilität untersucht werden, wobei sie auch unregelmäßige, nicht kugelförmige Formen annehmen können [377]. Prinzipiell können also Aktionspotentiale mittels ihrer *Wavelet*-Koeffizienten klassifiziert werden. Allerdings sind hier weitere Untersuchungen notwendig [378]. Dies betrifft insbesondere die anzuwendenden *Wavelet*-Familien, die Auswahl geeigneter Koeffizienten sowie die Anwendung nicht überwachter Cluster-Verfahren.

6.2.3 Analyse weiterer Merkmale möglicher Aktionspotentiale

Die Suche nach geeigneten, möglichst redundanzfreien Merkmalen zur Clusterung und Klassifizierung von Aktionspotentialen ist eines der zentralen Themen bei der Analyse von neuronalen Daten. Im Kontext dieses Sensorprojektes wurden deshalb zusätzlich die Koeffizienten einer Fourier-Reihe, siehe Gleichungen 6.16 und 6.17, die Koeffizienten der Kosinus-Transformation, siehe Gleichung 6.18 und erneut die Koeffizienten der *Wavelet*-Transformation, siehe Abschnitt 6.2.2, hinsichtlich ihrer Eignung bei der Klassifikation von *Spikes* bewertet. Diese Arbeiten erfolgten in Kooperation mit der Mathematischen-Naturwissenschaftliche Fakultät der Universität Rostock. Nachfolgend sollen die wichtigsten Ergebnisse dieser Untersuchung [379] vorgestellt werden.

$$f(k) = \frac{a_0}{2} + \sum_{n=1}^{m-1} \left[a_n \cos\left(\frac{2\pi n}{N} k\right) + b_n \sin\left(\frac{2\pi n}{N} k\right) \right] + \frac{a_m}{2} \cos(\pi k) \quad \text{mit } N \text{ gerade, } m = \frac{N}{2} \quad (6.16)$$

$$f(k) = \frac{a_0}{2} + \sum_{n=1}^m \left[a_n \cos\left(\frac{2\pi n}{N} k\right) + b_n \sin\left(\frac{2\pi n}{N} k\right) \right] \quad \text{mit } N \text{ ungerade, } m = \frac{N-1}{2} \quad (6.17)$$

Die Koeffizienten werden erneut mit dem einfach zu implementierenden und ressourcenschonenden *K-Means*-Verfahren in Cluster eingeteilt. Zu Beginn des Verfahrens werden zufällig k Schwerpunktvektoren aus dem zu partitionierenden Datensatz ausgewählt. Anschließend werden die verbleibenden Vektoren mittels Distanzmaß dem nächstliegenden Cluster zugeteilt und dessen Schwerpunkt aktualisiert. Oftmals werden mit diesem Ansatz jedoch nur lokale Extrema gefunden. Mittels Mehrfachstarts des Algorithmus und geänderter Schwerpunktvektoren kann das gewünschte globale Extrem mit höherer Wahrscheinlichkeit berechnet werden. Zudem werden die Vektoren zur Verbesserung der Clusterung normiert. Grundsätzlich benötigt aber *K-Means* vor der Partitionierung der Daten die Anzahl der Cluster. Aus diesem Grund werden in [379] zwei Fehlermaße eingeführt, die zur Bewertung der Qualität einer Clusterung und zur Abschätzung der Clusterzahl der untersuchten Datenmenge verwendet werden.

In Gleichung 6.19 wird zunächst das Verhältnis ν aus dem Gesamtfehler und der Summe der Clusterabstände für die Menge M aller Merkmalsvektoren gebildet. Der Gesamtfehler berechnet sich für alle k Cluster aus der Summe der Distanzen D der Vektoren x_i eines Clusters M_j zu einem Repräsentanten P_{M_j} desselben Clusters und stellt somit ein Maß für die Kompaktheit der ermittelten Partitionen dar. Die Summe der Clusterabstände ermittelt sich aus der Summe der Distanzen zwischen dem Schwerpunkt des gesamten Datensatzes S_M und den Schwerpunkten S_{M_i} der k Cluster. Dieses Verhältnis wird zur Auswahl der besten Clusterung herangezogen, um aus einer Reihe von *K-Means*-Durchläufen für eine bestimmte Clusterzahl k die optimale Lösung zu finden.

$$X(n) = c_n \sum_{k=0}^{N-1} \cos\left(\frac{\pi n(2k+1)}{2N}\right) x(k) \quad \text{mit } c_0 = \frac{1}{\sqrt{N}}, \quad c_n = \sqrt{\frac{2}{N}} \quad (6.18)$$

Die zweite Methode zur Abschätzung der Clusterzahl ist in Gleichung 6.20, Gleichung 6.21 und Gleichung 6.22 zusammengefasst. In der Abschätzung gilt es die Clusterzahl k so zu wählen, dass der Ausdruck $C(k)$ maximiert wird. Es gehen dabei die Anzahl $|M|$ aller Merkmalsvektoren x des Datensatzes, die Anzahl der Vektoren $|M_i|$ in jedem Cluster und die Schwerpunkte S_M bzw. S_{M_i} in die Berechnung ein. Als weiterführende Literatur sei auf [380, 381] verwiesen. Dieses Verfahren wird nach der Berechnung der Verhältnisse ν angewendet, indem nach der Vorauswahl der besten Clusterung für ein konkretes k diejenige Clusterzahl gewählt wird, die $C(k)$ maximiert. Nach Abschluss der Clusterung liegt eine Trainingsmenge vor, in der die Zahl der Cluster und die Zugehörigkeit der Merkmalsvektoren zu den einzelnen Clustern bekannt sind.

$$\nu = \frac{\sum_{j=1}^k \sum_{x_i \in M_j} D(x_i, P_{M_j})}{\sum_{i=1}^k D(S_M, S_{M_i})} \quad (6.19)$$

$$C(k) = \frac{Sp(B)}{k-1} / \frac{Sp(W)}{n-k} \quad (6.20)$$

Mit dieser Trainingsmenge wird nun ein Klassifikator modelliert, der anschließend auch unbekannte Vektoren in Klassen einteilen kann. Es handelt sich dabei um ein Verfahren des überwachten Lernens. Es soll eine Funktion $f(x)$ konstruiert werden, die zusammen mit z. B. der Euklidischen Distanz dafür sorgt, dass der Vektor x des Trainingsdatensatzes wie gewünscht der Klasse C_i zugeordnet wird. Die Herausforderung besteht darin, den Klassifikator so zu entwerfen, dass nicht nur die Vektoren der Stichprobe sondern auch die verbleibenden Vektoren korrekt zugeordnet werden. Ein Lösungsweg besteht darin, möglichst einfache, z. B. lineare Funktionen mittels Trainingsdaten, heuristischen Argumenten und der Fisher-Diskriminante zu identifizieren. Die genaue Vorgehensweise dabei wird in [379] nicht beschrieben. Mit einer Programmbibliothek kann das Klassifikationsverfahren dennoch zügig implementiert werden.

Die maximale Clusterzahl wurde auf fünf festgelegt und die ersten 1000 *Spikes* einer Messung für die Clusterung genutzt. Die Erkennungsrate des Klassifikators bezüglich der Trainingsmenge und eine optische Kontrolle des Clusterergebnisses werden zur Bewertung der verwendeten Klassifikationsmerkmale genutzt. Die Auswahl möglicher Merkmalskoeffizienten erfolgt manuell in mehreren Versuchen. Es werden hierzu acht Approximationskoeffizienten der DWT, zehn Fourier-Koeffizienten und acht Koeffizienten der Kosinus-Transformation untersucht. Aufgrund einer unterschiedlich guten Eignung einzelner Koeffizienten wird für die Klassifikation unbekannter Messreihen schließlich eine Kombination aus zwei Fourier-Reihenkoeffizienten und einem DWT-Koeffizienten empfohlen. Eine Ergänzung dieses Merkmalsvektors um Koeffizienten der Kosinus-Transformation erbrachte keine Verbesserung der Erkennungsrate [379].

$$B = \sum_{i=1}^k |M_i| (S_{M_i} - S_M)(S_{M_i} - S_M)^T \quad (6.21)$$

$$W = \sum_{i=1}^k \sum_{j=1}^{|M_i|} (x_{ij} - S_{M_i})(x_{ij} - S_{M_i})^T \quad (6.22)$$

Anstelle der alleinigen Nutzung z. B. der klassischen Hauptkomponentenanalyse bzw. der *Wavelet*-Transformation verwendet dieser Klassifikationsansatz eine Kombination von Merkmalen. Zudem wird die Qualität der erzielten Clusterung objektiv mittels Fehlermaßen bewertet und in diesem Sinne die optimale Clusterung ausgewählt. Die in dieser Untersuchung vorgenommene manuelle Auswahl möglicher *Spike*-Merkmale anhand von Heuristiken könnte einer Automatisierung der Clusterung jedoch entgegenstehen. Die getroffene Festlegung auf bestimmte Merkmale auch für eine zukünftige Klassifizierung scheint aufgrund der Variabilität von MEA-Experimenten problematisch zu sein. Die Analyse der statistischen Unabhängigkeit einzelner *Spike*-Merkmale in Abhängigkeit des Datensatzes könnte deshalb ein interessanter Lösungsvorschlag sein [382]. Die Nutzung synthetisierter *Spike*-Daten mit definierter Zusammensetzung könnte die Ergebnissbewertung der nachfolgenden Klassifizierung vereinfachen.

6.3 Klassifikationsbeispiel

6.3.1 Datensynthese

Der Vergleich von Detektions- und Klassifizierungsansätzen erfordert MEA-Daten mit bekannter Zusammensetzung. Zur genauen Bestimmung dieser Zusammensetzung sind Zellfärbemethoden aufgrund der erforderlichen Zeitaufösung genauso ungeeignet wie die wenig praktikable gleichzeitige intra- und extrazelluläre Messung an einem Zellnetzwerk. Die Wiederverwendung von neuronalen Messungen zur Bewertung eines Klassifikationsansatzes erfordert dagegen das Vorhandensein hierfür geeigneter Daten. Bisherige Simulationen von neuronalen Datensätzen gehen zudem von stark vereinfachten Modellen aus. Ein alternativer Ansatz nutzt ein Ersatzschaltbild zur Beschreibung der Geometrie des Neurons in Bezug zur Elektrode und zur Erfassung des möglichen Einflusses von Gliazellen auf das Messsignal. Mit vorgegebenen intrazellulären *Spike-Templates* wird der Signalweg vom Zellinneren bis zur MEA-Elektrode simuliert, wobei sowohl Neuronen in Elektrodennähe als auch Neuronen mit größeren Abstand zum Sensor berücksichtigt werden. Das Ergebnis dieser Synthese ist ein Signal $s_k(t)$ gemäß Gleichung 6.23 [383, 384].

Bei der Betrachtung eines Neurons N_j entspricht $v_k(N_j, t)$ den *Spikes* dieses Neurons. Der Anteil $v_k(N_p, t)$ repräsentiert Aktivität, welche nicht durch die *Spikes* von N_j verursacht wurde. Das Rauschen der Messanordnung ist in $n(t)$ zusammengefasst. Das mit der MEA-Elektrode detektierte Signal $v_k(N_j, t)$ berechnet sich aus der gewichteten Summe des intrazellulären Aktionspotentials und dessen ersten und zweiten Ableitung nach der Zeit, wobei diese Signalanteile von verschiedenen Regionen der Neuronoberfläche stammen. Der dominierender Teil der Störung $v_k(N_p, t)$ resultiert aus der korrelierten und der (relativ) unkorrelierten Spike-Aktivität entfernter Neuronen. Der Rauschanteil $n(t)$ wird schließlich durch vollständig unkorrelierte, externe elektromagnetische Störungen und die Verstärkerelektronik verursacht. Zahlreiche Kenngrößen, wie z. B. der minimale Abstand zwischen *Spikes* und die statistische Verteilung der Aktionspotentiale sowie die der korrelierten und unkorrelierten Aktivität, lassen sich bei dieser Synthese definieren. Das beliebig skalierbare Signal $s_k(t)$ entspricht schließlich der linearen Überlagerung der gewichteten Signalanteile, ihren ersten beiden Ableitungen sowie einem Rauschanteil $n(t)$ [277].

$$s_k(t) = v_k(N_j, t) + \sum_{p \neq j} v_k(N_p, t) + n(t) \quad (6.23)$$

$$\text{SNR} = \frac{\text{Spitzenwert des Signals}}{\text{Spitzenwert der Störung}} \quad (6.24)$$

Für die Untersuchungen in den nächsten Abschnitten wurden deshalb definierte MEA-Daten generiert, welche jeweils zwei *Target Units* und Rauschen besitzen. Die benutzten intrazellulären *Spike-Templates* wurden mit HHSim (*Hodgkin Huxley Simulator*) generiert [385] bzw. der Literatur entnommen [386]. Für die Datensynthese wurden die Parameter

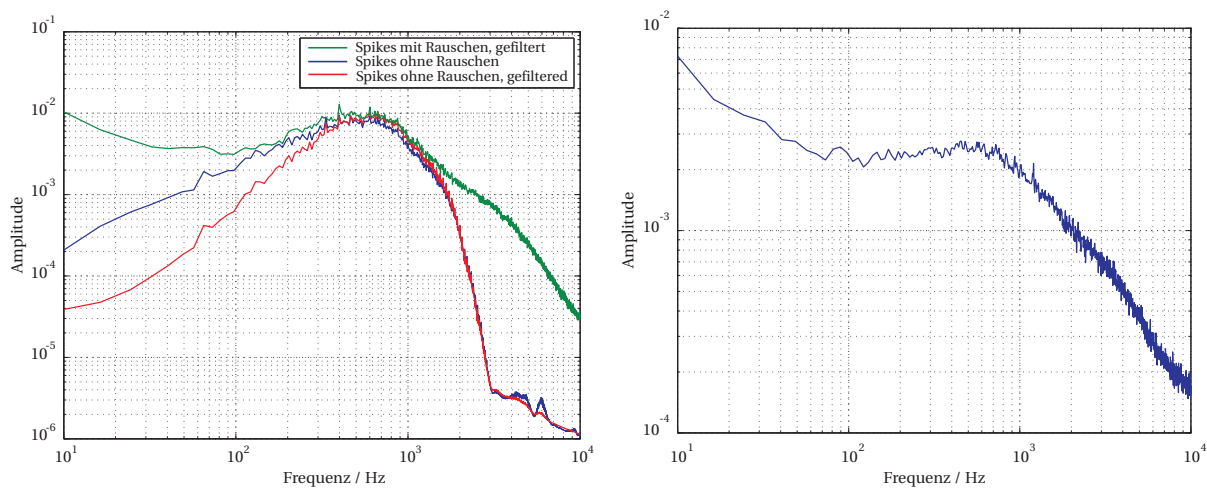
der Simulationssoftware *Noisy Spike Generator*, wie z. B. die Wichtungen und die statistische Verteilung der Aktionspotentiale, aus [387] weitgehend übernommen. In die Synthese gingen somit sieben korrelierte und 15 unkorrelierte *Units* ein. Für beide *Target Units* wurde das gleiche *Template* genutzt. Aufgrund einer unterschiedlichen Wichtung der einzelnen Signalanteile besitzen die Aktionspotentiale dieser *Units* aber verschiedene Verläufe. Für die Untersuchungen wurde die SNR-Berechnung an die Definition von Smith et al. gemäß Gleichung 6.24 angelehnt, da das sonst übliche Verhältnis von Signalleistung zur Rauschleistung von der *Spike-Rate* der *Units* abhängig wäre. Problematisch an dem Ansatz nach Smith et al. könnte jedoch sein, dass nur die korrelierte und die unkorrelierte Hintergrundaktivität in der Umgebung der MEA-Elektrode, also die Störungen durch andere Neuronen, in die SNR-Betrachtung einbezogen werden. Das Rauschen $n(t)$ des Sensorsystems aufgrund der Signalkonditionierung kann zwar durch ein geeignetes Design und einem zweckmäßigen Messaufbau reduziert aber nicht völlig beseitigt werden und sollte deshalb mit berücksichtigt werden.

MEA-Messungen weisen neben dem biologischen Rauschen auch Elektrodenrauschen, elektronisches Rauschen sowie Störungen externer Quellen auf. Studien zeigen, dass das Elektrodenrauschen auf die ohmsche Komponente der Elektrodenimpedanz zurückgeführt und z. B. mit einer Platin-Beschichtung reduziert werden kann. Das Elektronikrauschen lässt sich durch die sorgfältige Verstärker- und Filterwahl begrenzen. Eine Schirmung des Messsystems kann externe elektromagnetische Störungen weitgehend vermeiden. Dennoch kann das resultierende Rauschen gemessen und auf entsprechenden Rauschquellen, wie z. B. Elektrodenimpedanz, *Bias*-Widerstand, Verstärker und externe Störungen, zurückgeführt werden [48]. Eigene Rauschmessungen bestätigen diesen Zusammenhang. Weitere Arbeiten zeigen, dass das kortikale Rauschen im Bereich von 5 μV bis 10 μV effektiv liegen kann [220] und MEA-Daten ein neuronales Hintergrundrauschen im Bereich von 10 μV bis 30 μV effektiv aufweisen können. Bei Tests wurde dabei ein Rauschen des Messsystems ohne Zellen von 5,9 μV effektiv ermittelt [388, 389]. Das technische und das neuronale Rauschen können somit in einer ähnlichen Größenordnung liegen.

Für die nachfolgenden Untersuchungen wurden deshalb die Daten einer realen Rauschmessung mit berücksichtigt. Diese Messung ohne Zellkultur am Chip YAA1 34, Kanal 2, wurde bereits im Abschnitt 5.1.3.3 detailliert im Zeit- und Frequenzbereich charakterisiert. Das Rauschsignal wurde dem mittels *Noisy Spike Generator* synthetisierten Datensatz additiv hinzugefügt. Dieses reale Rauschen ersetzt das (in der Standardeinstellung jener Software vernachlässigbare) Gauß-verteilte weiße Rauschen $n(t)$. Die Effektivwerte des neuronalen und des technischen Rauschens sind dabei identisch. Vor der Summation wurden die einzelnen synthetisierten Signal- und Rauschkomponenten entsprechend den Ergebnissen aus Abschnitt 5.1.3 gefiltert. Die Störung in Gleichung 6.24 ergibt sich nun aus der Summe des korrelierten, des unkorrelierten und des technischen Rauschens. Mithilfe des *Noisy Spike Generator* wurden zunächst Datensätze definierter Zusammensetzung für die Signalcharakterisierung erstellt, da so *Spikes* und Rauschen vollständig separat untersucht werden können. Schließlich erfolgte die Datensynthese für die eigentliche Klassifikation.

6.3.2 Signalcharakterisierung und -aufbereitung

Es wurde bereits im Abschnitt 6.1.2 mittels Simulationen gezeigt, dass sich die Detektion von Aktionspotentialen in einem neuronalen Signal mittels Amplitudenschwelle *online* realisieren lässt. Eine zuverlässige Detektion erfordert einen möglichst großen Signalrauschabstand, weshalb vor der Detektion das Sensorsignal mit der diskreten *Wavelet*-Transformation entrauscht wurde. Gemäß Abschnitt 5.3.1 und 6.1.2 wurde das Daubchies $db2^2$ -*Mother Wavelet* für diese digitale Filterung verwendet, da es für die Zerlegung und die Rekonstruktion eines Signals jeweils nur vier Koeffizienten benötigt und einen *Spike*-ähnlichen Verlauf besitzt. Das mit dieser DWT abgeschätzte Rauschniveau des Sensorsignals wurde zusätzlich zur Berechnung der Höhe der Detektionsschwelle genutzt. Die Detektion erfolgte nach dem *Denoising* und der Signalrekonstruktion im Zeitbereich.



(a) Amplitudenspektren eines synthetisierten, neuronalen Signals und Rauschen

(b) Amplitudenspektrum einer realen Messung an Herzmuskelzellen mittels BISC-Sensor

Abbildung 6.1: Vergleich der Amplitudenspektren eines synthetisierten, neuronalen Signals mit dem einer realen Messung an Herzmuskelzellen. Diese Messung wurde entsprechend Kapitel 7 durchgeführt. Aufgrund der Skalierung sind die Maßeinheiten der Amplituden willkürlich.

Diese Simulationen gingen von weißem, Gauß-verteilterm Rauschen gemäß [347] aus, welches gut mit dem feinsten Detailband $d1$ abgeschätzt werden kann. Bereits bei der Verwendung von realen Messreihen musste die an das Rauschen gekoppelte Detektionsschwelle angehoben werden. Die Annahme von weißem Rauschen kann auch für das BISC-System nicht gelten, da dieser Neurosensor die MEA-Signale *on chip* bandbegrenzt, siehe auch Abbildung 5.13. In der Abbildung 6.1(a) ist das Amplitudenspektrum eines gemäß Abschnitt 6.3.1 synthetisierten, neuronalen Signals dargestellt, welches entsprechend des BISC-Sensoraufbaus gefiltert wurde. Die mit realistischem Rauschen versehene Folge von Aktionspotentialen wird aufgrund der *on chip* Signalkonditionierung in ihrer Bandbreite begrenzt. Das trifft auch für das vollständig rauschfreie *Spike*-Signal zu. Zum Vergleich ist

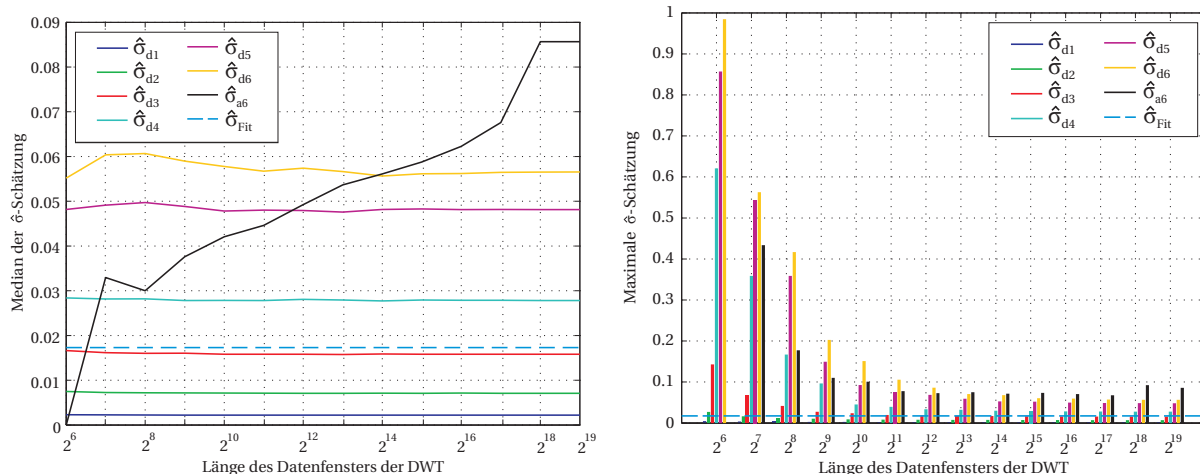
²Es wird die *Wavelet*-Bezeichnung von MATLAB[®] genutzt

in Abbildung 6.1(b) das Spektrum einer Messung an Herzmuskelzellen dargestellt, welche mit dem BISC-System im so genannten *Streaming*-Modus entsprechend Kapitel 7 durchgeführt wurde.

Die Abbildung 6.1(a) zeigt auch, dass die Signalenergie des neuronalen Signals sich in einem relativ schmalen Frequenzbereich konzentriert und die Bandbegrenzung rechtfertigt. Da das $d1$ -Band der DWT etwa dem Frequenzbereich zwischen einem Viertel und der Hälfte der Abtastfrequenz F_S entspricht, wird eine Rauschabschätzung in $d1$ nach Donoho et al. aufgrund der Bandbegrenzung aber zu niedrig ausfallen. Anstatt dieses globalen *Denoising*-Verfahrens müsste nun eine skalenabhängige Schätzung und Unterdrückung des Rauschens $\hat{\sigma}_i$ in jedem Detailband d_i erfolgen [390]. Diese alternative Schätzung für ein nicht Gauß-verteiltetes Rauschen wird aber durch die Aktivitätsrate der erfassten *Units* beeinflusst, da bei einer DWT lediglich das Band $d1$ fast nur (hochfrequentes) Rauschen aufweist. Die Abbildung 6.1(b) zeigt auch, dass das Amplitudenspektrum des synthetisierten und „analog“ gefilterten Neurosignals vergleichbar mit dem Spektrum einer realen Zellmessung ist.

Zusätzlich kann bei einer *online Wavelet*-Transformation immer nur eine begrenzte Zahl von Abtastwerten berücksichtigt werden. In den Abbildungen 6.2(a) und 6.2(b) ist deshalb der Median bzw. das Maximum der Rauschabschätzung in den einzelnen DWT-Bändern in Abhängigkeit der Transformationsgröße erfasst. Die Berechnung erfolgte anhand eines synthetisierten Signals, $F_S = 20$ kHz, 2 *Units*, SNR = 2, und einer sechsstufigen db2-DWT. Bereits bei einer Transformation mit 2^6 Abtastwerten, der Mindestzahl für eine sechsfache DWT, liefert die Schätzung $\hat{\sigma}$ im Detailband $d3$ als Median ein Ergebnis in der Nähe des Rauschdatenfits $\hat{\sigma}_{Fit}$. Die $d3$ -Skala wird bei $F_S = 20$ kHz von der analogen Signalkonditionierung des BISC im Gegensatz zu $d2$ und $d1$ also weniger beeinflusst. Für größer werdende Datenfenster reduziert sich die maximale Schätzung $\hat{\sigma}_{d3}$ rasch. Die Tabelle 6.1 zeigt zudem, dass sich $\hat{\sigma}_{d3}$ unabhängig von der *Unit*-Zahl in der Größenordnung von $\hat{\sigma}_{Fit}$ befindet. Ein ähnliches Verhalten von $\hat{\sigma}_{d3}$ lässt sich mit Einschränkungen auch für $F_S = 33,3$ kHz zeigen, siehe Abbildungen 6.3(a), 6.3(b) sowie Tabelle 6.2. Beide Abtastfrequenzen sind derzeit im BISC-Sensorsystem implementiert.

Durch die geeignete Wahl eines *Wavelet* ist es möglich, die Energie des analysierten Signals in wenigen *Wavelet*-Koeffizienten zu konzentrieren. In Bezug auf die Rauschunterdrückung ist die Verteilung dieser Signalenergie auf die einzelnen Bänder der DWT interessant. Diese Verteilung wurde anhand synthetisierter, MEA-typischer Signale für $F_S = 20$ kHz bzw. $F_S = 33,3$ kHz untersucht. Diese Daten wurden entsprechend des BISC 02 „analog“ gefiltert und mittels db2-*Wavelet* fünf- bzw. sechsstufig zerlegt. Vor der Signalrekonstruktion wurden in mehreren Versuchen nacheinander jeweils ein Detailband und schließlich das größte Approximationsband gelöscht. In Tabelle 6.3 ist die maximale prozentuale Abweichung der rekonstruierten Signalform nach Gleichung 6.25 aufgrund des Löschens der einzelnen Bänder aufgeführt. Bei einer Abtastfrequenz von $F_S = 20$ kHz konzentriert sich die Signalenergie der MEA-Signale im Wesentlichen in den Bändern $d4$ bis $a5$. Bei $F_S = 33,3$ kHz verschiebt sich die Signalenergie hin zu Bändern höherer Zerlegungsstufen.



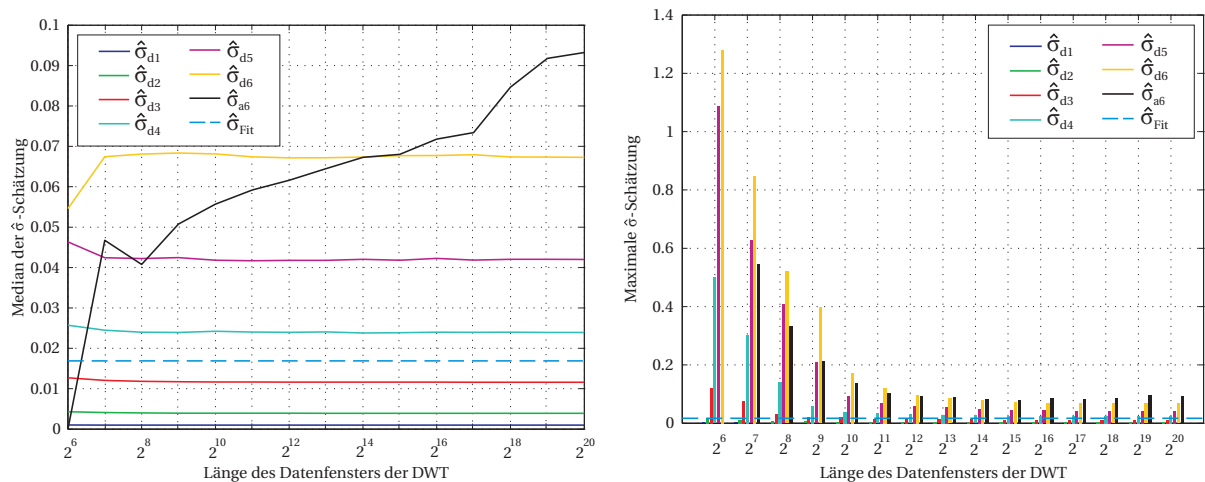
(a) Median der Rauschabschätzung in Abhängigkeit zur Länge der DWT (b) Maximale Rauschabschätzung in Abhängigkeit zur Länge der DWT

Abbildung 6.2: Synthetisierte MEA-Daten wurden mit db2-DWT sechsstufig zerlegt, 2^{19} Abtastwerte bei $F_S = 20$ kHz, 2 Units, SNR = 2. DWT-Länge wurde von 2^6 Samples (ca. 3,2 ms) bis 2^{19} Samples (ca. 26,2 s) variiert. Rauschschätzung in jedem DWT-Band gemäß $\hat{\sigma} = \text{MAD}(Y_i)/0,6745$ bzw. über Datenfit bestimmt. Die Maßeinheit für $\hat{\sigma}$ ist aufgrund der Skalierung willkürlich.

Units	1	2	3	4	5	6	7	8	$(8)^3$
$\hat{\sigma}_{d1}$	0,001	0,0022	0,0022	0,0021	0,0033	0,0047	0,004	0,0041	0,004
$\hat{\sigma}_{d2}$	0,0031	0,0069	0,0071	0,0067	0,0106	0,0152	0,0128	0,0132	0,0125
$\hat{\sigma}_{d3}$	0,0067	0,0155	0,0162	0,0152	0,0245	0,0349	0,0299	0,0307	0,0271
$\hat{\sigma}_{d4}$	0,0114	0,0272	0,029	0,0271	0,0439	0,0638	0,0543	0,0563	0,0467
$\hat{\sigma}_{d5}$	0,0202	0,0477	0,0528	0,0504	0,0809	0,115	0,0994	0,1054	0,0822
$\hat{\sigma}_{d6}$	0,024	0,0567	0,0603	0,0598	0,0973	0,1329	0,1173	0,1262	0,097
$\hat{\sigma}_{a6}$	0,0378	0,0846	0,0846	0,0797	0,1314	0,1849	0,1603	0,1667	0,1534
$\hat{\sigma}_{Fit}$	0,0074	0,017	0,0171	0,0165	0,0252	0,0364	0,0321	0,0328	0,0328
$\hat{\sigma}_{calc}$	0,0086	0,0189	0,0191	0,018	0,0286	0,0415	0,0349	0,0357	0,0357

Tabelle 6.1: Synthetisierte MEA-Daten wurden mit der db2-DWT sechsstufig zerlegt, $F_S = 20$ kHz, DWT-Länge = 2^{19} Samples (ca. 26,2 s), SNR = 2. Rauschschätzung in jedem DWT-Band gemäß $\hat{\sigma} = \text{MAD}(Y_i)/0,6745$ bzw. über Datenfit oder direkte Berechnung bestimmt. Die Maßeinheit für $\hat{\sigma}$ ist aufgrund der Skalierung willkürlich.

³Zum Vergleich wurde nur das Rauschen des Datensatzes mit acht Units ausgewertet.



(a) Median der Rauschabschätzung in Abhängigkeit zur Länge der DWT (b) Maximale Rauschabschätzung in Abhängigkeit zur Länge der DWT

Abbildung 6.3: Synthetisierte MEA-Daten wurden mit der db2-DWT sechsstufig zerlegt, 2^{20} Abtastwerte bei $F_S = 33,3$ kHz, 2 Units, SNR = 2. DWT-Länge wurde von 2^6 Samples (ca. 1,9 ms) bis 2^{20} Samples (ca. 31,5 s) variiert. Rauschschätzung in jedem DWT-Band gemäß $\hat{\sigma} = \text{MAD}(Y_i)/0,6745$ bzw. über Datenfit bestimmt. Die Maßeinheit für $\hat{\sigma}$ ist aufgrund der Skalierung beliebig.

Units	1	2	3	4	5	6	7	8	(8) ⁴
$\hat{\sigma}_{d1}$	0,0005	0,0011	0,001	0,0011	0,0018	0,0017	0,0024	0,0021	0,0021
$\hat{\sigma}_{d2}$	0,0018	0,0045	0,0038	0,0045	0,0071	0,0067	0,0095	0,0086	0,0083
$\hat{\sigma}_{d3}$	0,0053	0,0133	0,0115	0,0134	0,0211	0,002	0,0283	0,0258	0,0241
$\hat{\sigma}_{d4}$	0,0107	0,0274	0,024	0,0281	0,0444	0,0427	0,0601	0,0556	0,0487
$\hat{\sigma}_{d5}$	0,0182	0,0472	0,0428	0,0495	0,079	0,0775	0,1055	0,0998	0,0835
$\hat{\sigma}_{d6}$	0,0283	0,0748	0,0681	0,0803	0,1298	0,127	0,1708	0,166	0,1326
$\hat{\sigma}_{a6}$	0,0436	0,1064	0,0905	0,1086	0,1745	0,1636	0,2354	0,217	0,197
$\hat{\sigma}_{Fit}$	0,0074	0,0185	0,0163	0,0185	0,0309	0,0295	0,0383	0,0358	0,0358
$\hat{\sigma}_{calc}$	0,0088	0,0216	0,0181	0,0214	0,0334	0,0316	0,0454	0,041	0,041

Tabelle 6.2: Synthetisierte MEA-Daten wurden mit der db2-DWT sechsstufig zerlegt, $F_S = 33,3$ kHz, DWT-Länge = 2^{20} Samples (ca. 31,5 s), SNR = 2. Rauschschätzung in jedem DWT-Band gemäß $\hat{\sigma} = \text{MAD}(Y_i)/0,6745$ bzw. über Datenfit oder direkte Berechnung bestimmt. Die Maßeinheit für $\hat{\sigma}$ ist aufgrund der Skalierung willkürlich.

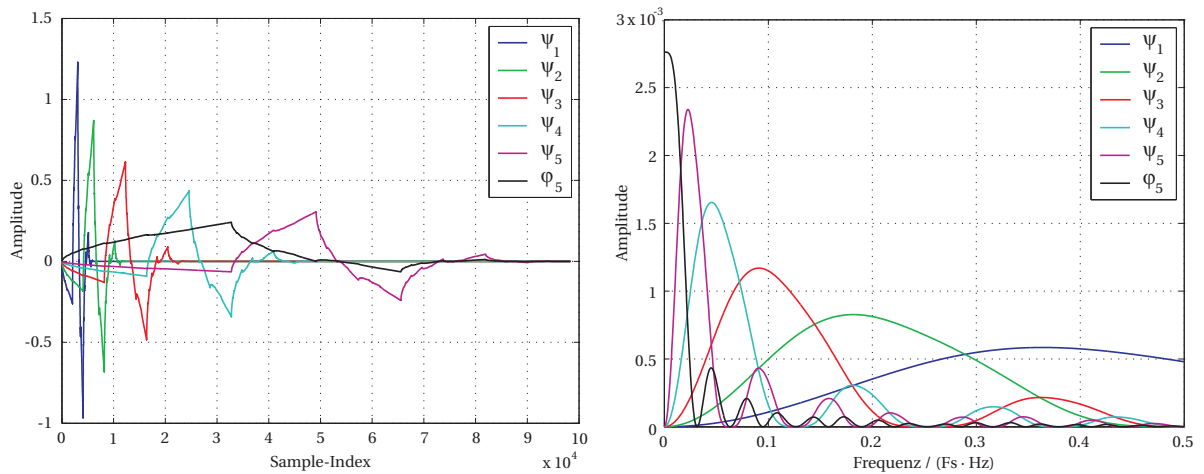
⁴Zum Vergleich wurde nur das Rauschen des Datensatzes mit acht Units ausgewertet.

Diese Filtereigenschaft der DWT kann mit den Abbildungen 6.4(a) und 6.4(b) verdeutlicht werden. Dort wurden die *Wavelets* mit Skalierungsfunktion und die entsprechende Filterbankcharakteristik für eine fünfstufige Signalzerlegung dargestellt. Da die Frequenzantwort der *Wavelet*-Filterbank von der Abtastfrequenz F_S abhängt, verschiebt sie sich direkt proportional zu F_S . Durch das Löschen einzelner Bänder der DWT kann eine zusätzliche Filterung im rekonstruierten Neurosignal erzielt werden. Eine niederfrequente Hochpassfilterung kann z. B. durch das Löschen des größten Approximationsbandes realisiert werden. In den Abbildungen 6.5(a) und 6.5(b) kann man erkennen, dass eine solche Hochpassfilterung durch das Einfügen einer weiteren Zerlegungsstufe in die *Wavelet*-Filterbank, $db2$, $F_S = 20$ kHz, weniger tieffrequente Anteile des synthetisierten Neurosignals unterdrückt. Ein vergleichbarer Zusammenhang lässt sich auch für die Tiefpassfilterung höherer Signalfrequenzen und für andere Abtastraten zeigen.

Da eine Filterung immer auch eine Formveränderung des Ausgangssignals verursacht, ist in Tabelle 6.4 die maximale prozentuale Veränderung der rekonstruierten Signalform nach Gleichung 6.25 aufgrund des Löschens einer Kombination von Detail- und Approximationsbänder dargestellt. Man sieht, dass durch das Hinzufügen einer weiteren Zerlegungsstufe der diskreten *Wavelet*-Transformation die Signalformveränderung aufgrund der *Wavelet*-basierten Filterung um eine Größenordnung reduziert werden kann. Dieses Ergebnis ist mit Hinblick auf das niederfrequente Sensorrauschen des BISC bemerkenswert, siehe auch Abbildung 6.1(a). Neben einer Abschätzung und Unterdrückung des Rauschens anhand der Detailkoeffizienten nach Donoho et al. kann somit auch eine Signalfilterung mittels Zurücksetzen des größten Approximationsbandes sinnvoll sein.

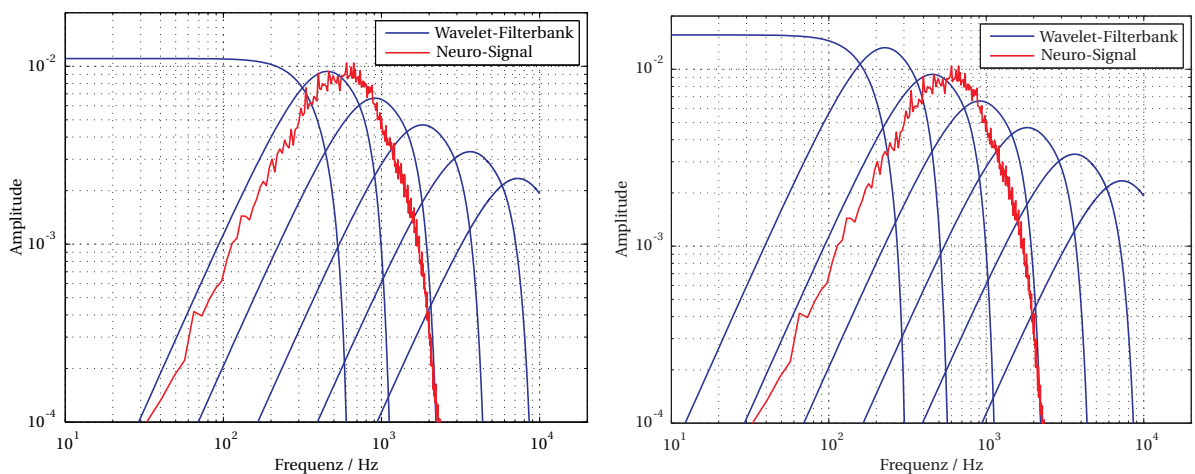
$$\text{max. proz. Abweichung} = \max \left(\left| \frac{\overrightarrow{\text{Originalsignal}} - \overrightarrow{\text{rekonstr. Signal}}}{\overrightarrow{\text{Originalsignal}}} \right| \cdot 100 \right) \quad (6.25)$$

Neuronale Aktionspotentiale von Ratten bzw. Mäusen können bei extrazellulärer Messung Amplituden in der Größenordnung von einigen hundert Mikrovolt Spitze-Spitze aufweisen [88, 112]. Der Eingangsspannungsbereich der AD-Wandler des Sensorsystems würde dann die maximale *on chip* Verstärkung der MEA-Signale nahe legen. Die Kennlinien in Abschnitt 5.1.3.2 zeigen, dass die Verstärker des BISC 02 in diesem Fall nur eine Bandbreite von ca. 2 kHz aufweisen und somit die Abtastfrequenz im Vergleich zur aktuellen Realisierung ohne Informationsverlust deutlich reduziert werden könnte. Die Simulationsergebnisse weisen zudem darauf hin, dass die höherfrequenten DWT-Bänder aufgrund der analogen BISC-Signalaufbereitung nach der Rauschunterdrückung weitgehend gelöscht werden. Eine kleinere Abtastfrequenz würde zudem geringere Echtzeitanforderungen an die implementierte Signalvorverarbeitung stellen und eine verbesserte Rauschabschätzung mittels $d1$ -Band ermöglichen. Dieser etwas provokante Ansatz führt aber zu einer geringeren zeitlichen Auflösung der digitalisierten Aktionspotentiale, welche bei einer Form-basierte Klassifizierung problematisch sein könnte.



(a) Skalierte *Wavelets* und die Skalierungsfunktion der db2-Familie (b) Amplitudengang der dyadischen db2 *Wavelet*-Filterbank in Abhängigkeit der Samplingfrequenz F_S

Abbildung 6.4: Für eine fünfstufige Daubechies db2-DWT wurden die skalierten *Wavelets* und die Skalierungsfunktion dargestellt sowie der Amplitudengang dieser Filterbank in Abhängigkeit von F_S berechnet. Die Maßeinheiten der Amplituden bzw. der *Sample*-Index sind aufgrund der Skalierung willkürlich.



(a) Prinzipieller Amplitudengang einer dyadischen db2 *Wavelet*-Filterbank für eine fünfstufige Signalzerlegung und das Spektrum eines synthetisierten neuronalen Signals ohne Rauschen (b) Prinzipieller Amplitudengang der dyadischen db2 *Wavelet*-Filterbank für eine sechsstufige Signalzerlegung sowie das Spektrum eines synthetisierten neuronalen Signals ohne Rauschen

Abbildung 6.5: Die Amplitudengänge der db2 *Wavelet*-Filterbank wurden für $F_S = 20$ kHz berechnet und gemeinsam mit dem Spektrum eines synthetisierten, rauschfreien und „analog“ gefilterten MEA-Signals abgetragen (2 *Units*). Die Maßeinheit der Amplituden ist aufgrund der Skalierung willkürlich.

Gelöschte Bänder	$F_S = 20 \text{ kHz}$	$F_S = 33,3 \text{ kHz}$
	Abweichung / %	Abweichung / %
d1	0,03	0,01
d2	0,41	0,17
d3	5,13	2,3
d4	32,4	18,0
d5	51,3	48,6
a5	10,8	31,0
d6	9,57	27,18
a6	1,18	3,8

Tabelle 6.3: Maximale prozentuale Abweichung der Form des rekonstruierten Neurosignals nach dem Löschen einzelner Detail- und Approximationsbänder der db2 DWT nach einer fünf- bzw. sechsstufigen Signalzerlegung für unterschiedliche Abtastfrequenzen F_S . Die Bänder $d6$ und $a6$ liegen erst nach einer sechsstufigen DWT vor.

Gelöschte Bänder	$F_S = 20 \text{ kHz}$			$F_S = 33,3 \text{ kHz}$		
	Abweichung %	$F_g \text{ HP}$ Hz	$F_g \text{ TP}$ Hz	Abweichung %	$F_g \text{ HP}$ Hz	$F_g \text{ TP}$ Hz
d1, a5	10,8	312,5	5000	31,0	520,3	8325
d1, d2, a5	11,2	312,5	2500	31,2	520,3	4162,5
d1, d2, d3, a5	16,3	312,5	1250	33,5	520,3	2081,3
d1, a6	1,21	156,25	5000	3,81	260,2	8325
d1, d2, a6	1,62	156,25	2500	4,0	260,2	4162,5
d1, d2, d3, a6	6,75	156,25	1250	6,28	260,2	2081,3

Tabelle 6.4: Maximale prozentuale Abweichung der Form des rekonstruierten Neurosignals nach dem Löschen mehrerer Detail- und Approximationsbänder der db2 DWT nach einer fünf- bzw. sechsstufigen Signalzerlegung für unterschiedliche Abtastfrequenzen F_S . Zusätzlich sind die Grenzfrequenzen der durch die Koeffizientenlöschung entstehenden Hoch- und Tiefpassfilter angegeben. Das Band $a6$ liegt erst nach einer sechsstufigen DWT vor.

Die diskrete *Wavelet*-Transformation kann in jeder Skale als Faltung von Signal und *Wavelet* mit anschließendem *Downsampling* angesehen werden. Bei jeder Faltung zeitlich begrenzter Signale ergeben sich an den Intervallgrenzen Berechnungsprobleme, die im Falle der DWT in jeder Zerlegungsstufe auftreten [391]. Die einfachste Lösung besteht im Nullsetzen des Signals außerhalb des Definitionsbereiches. Da die *Wavelet*-Transformation gut zur Detektion von Unstetigkeiten geeignet ist, führen diese künstlichen Singularitäten zu erheblichen Fehlern bei der Signalrekonstruktion. Eine periodische Erweiterung ist meist besser. Alternativ kann die Funktion symmetrisch erweitert werden, um die Kontinuität an den Intervallgrenzen zu wahren. Jedoch weist dann die erste Ableitung der Funktion Unstetigkeiten auf [392]. Die Ergänzung eines Signals mit Nullen in Analogie zur FFT bzw. die periodische Signalerweiterung ermöglichen eine exakte Signalrekonstruktion, wenn auf eine Manipulation der ermittelten *Wavelet*-Koeffizienten verzichtet wird [393].

In der Tabelle 6.5 wurden die Signaldifferenz zwischen einer gefensterten, jeweils 128 Abtastwerte umfassenden DWT/IDWT und der DWT/IDWT des Gesamtsignals in Abhängigkeit der unter MATLAB[®] wählbaren DWT-Erweiterungsoptionen ausgewertet. Es wurde in beiden Fällen das *db2-Wavelet* genutzt und eine sechsfache Signalzerlegung, eine Rauschunterdrückung in Abhängigkeit von $\hat{\sigma}_{d_3}$ und eine Hochpassfilterung vor der Signalrekonstruktion durchgeführt. Als Vergleich diente die Transformation des gesamten Datensatzes, ähnlich einer *offline* Verarbeitung. Jeder dieser DWT-Erweiterungsmodi gewährleistet bei unveränderten Koeffizienten eine perfekte Signalrekonstruktion. In dieser Untersuchung konnte im Mittel mit dem periodischen Erweiterungsmodus bei minimaler Koeffizientenanzahl die geringste Abweichung zwischen gefensterter und nicht gefensterter Signalverarbeitung erzielt werden. Ein Nachteil dieser periodischen Erweiterung ist das Einfügen von Artefakten in das Signal, welche als mögliche *Spikes* detektiert werden können, siehe auch Abbildung 6.6. Aufgrund der besten *Denoising*-Ergebnisse wurde dieser Modus trotzdem für die weiteren Untersuchungen verwendet. Mit einer strikteren Detektionsbedingung kann die Extraktion dieser Artefakte weitgehend unterdrückt werden.

Das Sensorgesamtrauschen wurde in der Abbildung 6.7 analysiert. Dabei wurde simuliertes neuronales Rauschen, korreliert und nicht korreliert, sowie mit dem BISC 02 real gemessenes Sensorrauschen des *Rbias*-Modus berücksichtigt. Für kleine Rauschamplituden ist eine Normalverteilung erkennbar, die eine robuste Abschätzung mittels $\hat{\sigma} = \text{MAD}/0.6745$ näherungsweise rechtfertigt. Die Ausläufer der Verteilung deuten auf neuronale Signalanteile hin. Infolge der Bandbegrenzung des Neurosensors und der *Wavelet*-Filterung der MEA-Signale werden die Bänder *d1* und *d2* weitgehend gelöscht. Bei der IDWT fehlen deshalb annähernd die Frequenzantworten der jeweiligen Hoch- bzw. Bandpässe der *Wavelet*-Filterbank laut Abbildung 6.4(b). Die Signalrekonstruktion weist daher eine Änderung des höherfrequenten Amplitudenspektrums auf. Das *Denoising* führt auch zu einer geringeren Amplitude, weshalb das Verfahren auch *Shrinkage* genannt wird, siehe dazu Abbildung 6.8(a). In der Abbildung 6.8(b) ist zu erkennen, dass die Filterung auch Formveränderungen verursacht. Wichtig ist, dass die *Wavelet*-basierte Rauschunterdrückung nur auf das analog gefilterte und anschließend digitalisierte Sensorsignal angewendet werden kann.

DWT-Modus	Signaldifferenz			Signalerganzung
	Max	Mittel	Min	
symh	0,667	$1,72 \cdot 10^{-4}$	-0,7683	Symmetrisch
symw	0,65	$8,04 \cdot 10^{-5}$	-0,7087	Symmetrisch
asymh	0,3381	$-8,72 \cdot 10^{-3}$	-0,439	Anti-symmetrisch
asymw	1,0533	$2,12 \cdot 10^{-4}$	-1,1172	Anti-symmetrisch
zpd	0,3234	$-5,88 \cdot 10^{-3}$	-0,4154	<i>Zero Padding</i>
sp1	1,1461	$1,64 \cdot 10^{-4}$	-1,1795	Interpolation mit 1. Ableitg.
sp0	0,6635	$1,26 \cdot 10^{-4}$	-0,781	Konstant
ppd	0,4506	$1,35 \cdot 10^{-4}$	-0,432	Periodisch
per	0,3824	$8,16 \cdot 10^{-8}$	-0,4553	Periodisch mit min. Koeff.zahl

Tabelle 6.5: Anhand eines synth. MEA-Signals (2 Units, $F_S = 20$ kHz, SNR = 4,6, 30 s lang, Amplitudenskalierung [1,-1]) wurde die Signaldifferenz nach einer jeweils 128 Samples umfassenden db2-DWT/IDWT bei verschiedenen Erweiterungsmodi erfasst. Als Vergleich diente die Verarbeitung des gesamten Datensatzes. Nach der sechsfachen Signalzerlegung erfolgten eine Rauschunterdrückung und eine Hochpassfilterung. DWT Mode-Bezeichnung gemäß MATLAB[®].

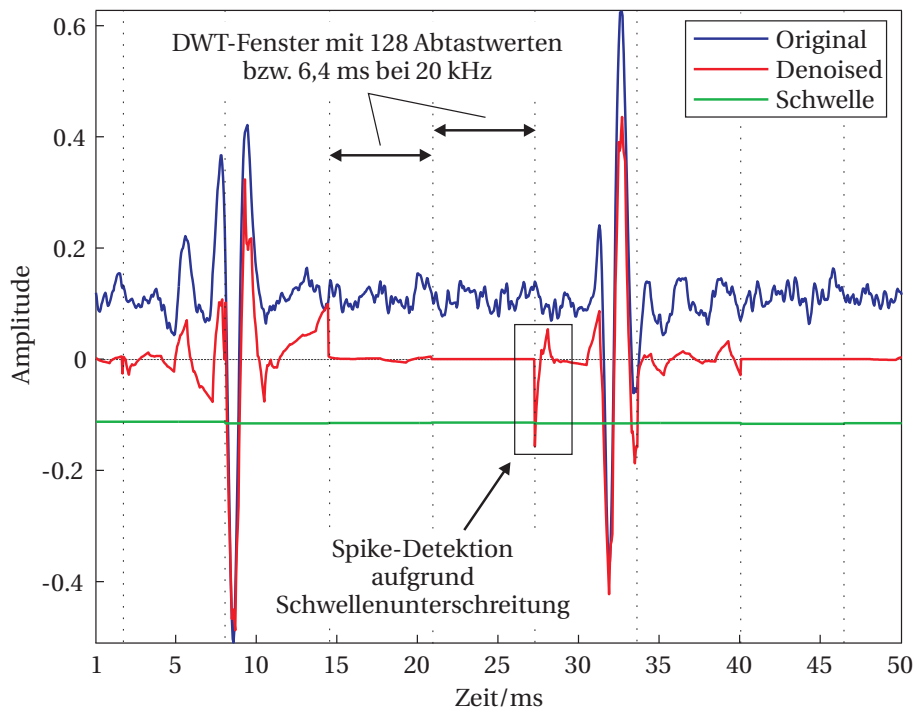


Abbildung 6.6: Ein synth. MEA-Signal (2 Units, $F_S = 20$ kHz, SNR = 4,6) wurde mittels DWT zerlegt (sechsstufig, db2). Die DWT wurde jeweils mit 128 Samples berechnet, DWT-Modus „per“. Vor der Signalrekonstruktion erfolgten eine Rauschunterdrückung und eine Hochpassfilterung. Artefakte aufgrund des Erweiterungsmodus können als *Spikes* detektiert werden. Zusätzlich wurde die Detektionsschwelle $-4\hat{\sigma}_{a3}$ abgetragen.

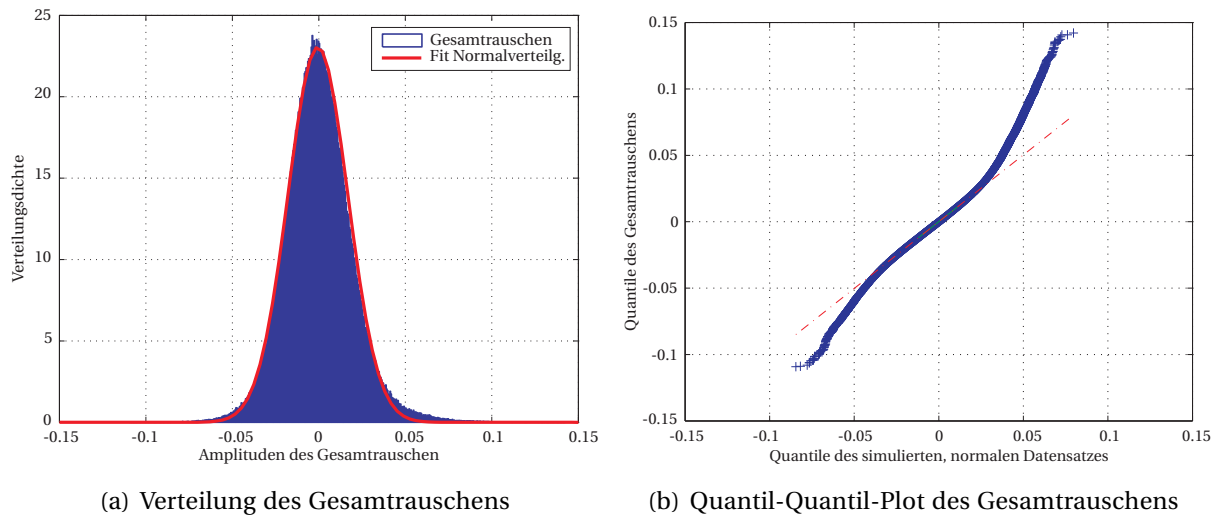


Abbildung 6.7: Anhand eines synthetisierten MEA-Datensatzes, $F_S = 20$ kHz, 27 s, 2 Units, SNR = 2, wurde das Gesamtrauschen analysiert. Es wurde simuliertes, neuronales Rauschen sowie real gemessenes Sensorrauschen, *Rbias*-Modus, berücksichtigt. Der Datensatz wurde entsprechend des BISC-Sensors „analog“ gefiltert. Zu Vergleichszwecken wurden mittels Fit die Parameter einer korrespondierenden Normalverteilung geschätzt. Die Maßeinheiten der Amplituden sind aufgrund der Skalierung willkürlich.

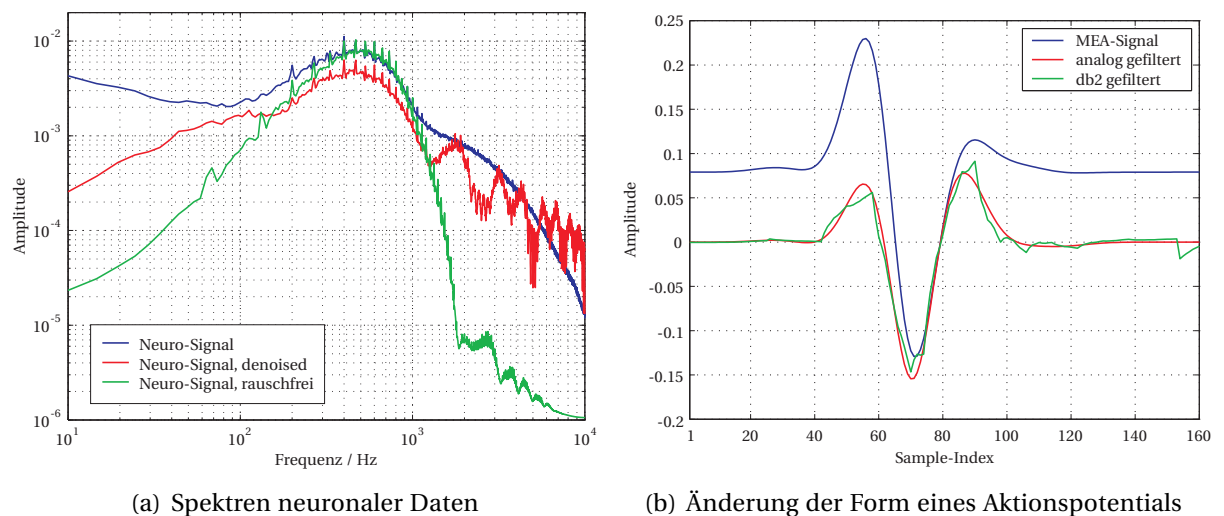


Abbildung 6.8: Anhand des erstellten Datensatzes der Abbildung 6.7 wurde auch die Änderung des Spektrums aufgrund der DWT-basierten Filterung untersucht. Es wurde eine db2-DWT mit jeweils 128 Abtastwerten bei einer sechsfachen Signalzerlegung berechnet. Die Rauschunterdrückung erfolgte durch das Löschen des größten Approximationsbandes a_6 , die globale Rauschabschätzung im Band d_3 und die Anwendung der Schwelle $\hat{\sigma}_{d_3} \sqrt{2 \log_e(n)}$ auf alle Detailbänder mittels *Soft-Thresholding*. Zusätzlich ist die prinzipielle Formveränderung eines *Spike* infolge der analogen sowie der *Wavelet*-basierten Filterung dargestellt. Die Maßeinheiten der Amplituden sind aufgrund der Skalierung willkürlich.

6.3.3 Zuordnung von Signalen mittels Kreuzkorrelation

Die Differenz zweier Signale $s(n)$ und $g(n)$ kann als Ähnlichkeitsmaß angesehen werden. Besitzen diese Signale eine endliche Energie E gemäß Gleichung 6.26, so ist auch ihre Differenz ein Energiesignal. Diese Energie kann nach Gleichung 6.27 ebenfalls als Ähnlichkeitsmaß interpretiert werden und entspricht dabei der mittleren quadratische Abweichung der Ausgangssignale. Die zu vergleichenden Signale können zudem so normiert werden, dass deren Energien den Wert eins annehmen und das resultierende Abweichungsmaß unabhängig von der absoluten Amplitude oder der Energie wird. Als Norm des Signals wird \sqrt{E} definiert. Das dann gemäß Gleichung 6.28 gefundene Maß wird als normierter Korrelationskoeffizient für Energiesignale bezeichnet [394]. Die Definition des Korrelationskoeffizienten setzt eine feste zeitlich Lage der zu vergleichenden Signale voraus [4].

$$E = \sum_{n=-\infty}^{\infty} s^2(n) \quad \text{mit } 0 < E_s < \infty \quad (6.26)$$

Bei einer Änderung der Lage der Signale zueinander ändert sich auch der Korrelationskoeffizient. Die Abhängigkeit des Korrelationskoeffizienten von der Signallage wird durch die normierte Korrelationsfunktion entsprechend Gleichung 6.29 beschrieben. Bei Energiesignalen wird hierfür auch der Begriff normierte Impulskorrelationsfunktion verwendet [4]. Die Berechnung der Korrelation auf einem Rechner kann nur mit endlich vielen, zeitdiskreten Abtastwerten erfolgen mit denen die Korrelation geschätzt wird. Bei der Kreuzkorrelation entspricht die Distanz zweier ggf. verschobener Signale der quadratischen Norm, welche bei maximaler Ähnlichkeit minimal wird [395]. *Matched Filter* stellen einen mit der Korrelation verwandten *Template Matching*-Ansatz dar [396].

$$E_{\Delta} = \sum_{n=-\infty}^{\infty} \left(\frac{s(n)}{\sqrt{E_s}} - \frac{g(n)}{\sqrt{E_g}} \right)^2 = 2 - 2 \sum_{n=-\infty}^{\infty} \frac{s(n)g(n)}{\sqrt{E_s E_g}} \quad (6.27)$$

$$p_{sg} = 1 - \frac{E_{\Delta}}{2} = \sum_{n=-\infty}^{\infty} \frac{s(n)g(n)}{\sqrt{E_s E_g}} \quad (6.28)$$

Unter der Annahme eines mit weißem Rauschen additiv gestörten Signals kann ein Filter mit der Impulsantwort $h(t)$ entworfen werden, welches zum Abtastzeitpunkt T ein maximales Verhältnis aus der Augenblicksleistung des Nutzsignals S_a und der Augenblicksleistung des Störsignals N gemäß Gleichung 6.30 liefert. Der rechte Bruch in diesem Ausdruck kann als Betragsquadrat des normierten Impulskorrelationskoeffizienten zwischen $h(t)$ und $s(T-t)$ aufgefasst werden. Eine zum Nutzsignal zeitgespiegelte Impulsantwort liefert hier ein maximales Signalrauschverhältnis, da das Betragsquadrat dann den Wert 1 annimmt. Ein solches Filter wird als Optimalfilter, *Matched Filter* oder Korrelationsfilter bezeichnet. Das Signalrauschverhältnis am Ausgang dieses Filters hängt nur von der Signalenergie E_s und der Leistungsdichte N_0 des Störsignals ab [4].

Die Kreuzkorrelation wurde zeitig zur Detektion so genannter „Wavelets“ in EKG (Elektrokardiographie)-Signalen eingesetzt, wobei z. B. die verwendeten *Templates* schrittweise nachgeführt wurden [397]. Die Kreuzkorrelation wurde ebenfalls zur Analyse von Aktionspotentialen eingesetzt [151]. So ermöglicht der ermittelte Korrelationskoeffizient aus „elastischem“ *Template* und gefensterter Kurvenform eine Verbesserung der *Spike*-Detektion [211]. Mittels Korrelation kann vor einer *Unit*-Separation auch die Ausrichtung von *Spike* und *Template* zueinander verbessert werden [222]. Die Korrelation wurde auch zur Klassifikation von Aktionspotentialen genutzt, wobei die Untersuchungen entlang einer Nervenfaser [398] oder im neuronalen Gewebe [399] stattfanden. Es ist zudem möglich, ganze *Spike Trains* mittels Korrelation auszuwerten, siehe u. a. [400]. In Abschnitt 3.2 werden weitere Form-basierte Klassifikationsansätze genannt, welche mit der Korrelation verwandte Abstandsmaße oder *Matched Filter* einsetzen.

$$p_{sg}(m) = \sum_{n=-\infty}^{\infty} \frac{s(n)g(n+m)}{\sqrt{E_s E_g}} \quad \text{bzw.} \quad \varphi_{sg}(m) = \sum_{n=-\infty}^{\infty} s(n)g(n+m) \quad (6.29)$$

$$\frac{S_a}{N} = \frac{E_s}{N_0} \cdot \frac{\left| \int_{-\infty}^{\infty} h(\tau)s(T-\tau)d\tau \right|^2}{\int_{-\infty}^{\infty} |h(\tau)|^2 d\tau \int_{-\infty}^{\infty} |s(T-\tau)|^2 d\tau} \quad (6.30)$$

Entsprechend Abschnitt 5.2 können die mit BISC-System gemessene Aktionspotentiale ebenfalls als Energiesignale aufgefasst werden. Deshalb wurde untersucht, ob die Kreuzkorrelation zur automatisierten Signalklassifikation einsetzen werden kann. In einer *offline* Lernphase lassen sich *Templates*, also die Modell-*Spikes* der einzelnen Klassen, mit gegebenen Klassenschranken einfach ermitteln. Diese *Template*-Bibliothek kann dann für die *online* Klassifizierung genutzt werden [401]. Eine Nachführung der *Templates* kann eine graduelle Formänderung der Aktionspotentiale berücksichtigen. Es können neue Klassen geschaffen werden, wenn sich *Spikes* nicht in die bestehenden Klassen einordnen lassen. Diese Aktualisierung bzw. Ergänzung der *Template*-Bibliothek kann jedoch die Abgrenzung der *Units* und die Interpretation des Klassifikationsergebnisses zunehmend erschweren [29, 402]. Die meist subjektive Bewertung der so gewonnenen *Templates* stellt ein wesentliches Hindernis für die Automatisierung dieses Ansatzes dar.

Es lassen sich bei diesem Verfahren in der Regel deutlich mehr als die zu erwartenden zwei bis drei Klassen bzw. *Units* pro MEA-Elektrode finden [403]. Eine Vorgabe der Klassengrenzen erweist sich aufgrund der eingeschränkten Reproduzierbarkeit von MEA-Messung als ungeeignet. Relevante *Templates* müssen in Abhängigkeit des Datensatzes, idealerweise selbstständig, bestimmt werden. Die in den Abschnitten 6.2.1, 6.2.2 und 6.2.3 beschriebenen Verfahren stellen hierzu einen ersten Schritt dar. Allerdings sind weitere Untersuchungen bis zur zuverlässigen, nicht überwachten Nutzung dieser Ansätze erforderlich [364]. Für die Analysen im nächsten Abschnitt wurden deshalb die *Templates* der einzelnen *Units* vorab bereitgestellt und während der Klassifikation nicht nachgeführt.

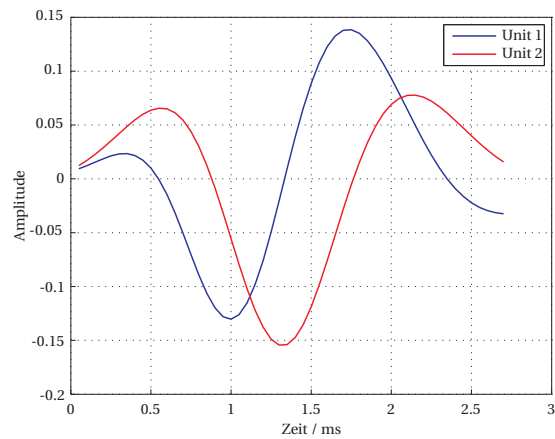
6.3.4 Detektion und Klassifikation

Zur Objektivierung der Detektion und Klassifikation von Aktionspotentialen wurden nur synthetisierte, eindeutig definierte Datensätze verwendet. Bei diesen simulierten, MEA-typischen Daten war im Gegensatz zur alternativen, manuellen Klassifizierung echter MEA-Messungen die genaue Zusammensetzung, auch *Ground Truth*, bekannt. Es wurden vier 30 s lange Datensätze mit jeweils 2 *Units* und Rauschen generiert. Das Rauschen besaß einen synthetisierten neuronalen Anteil, korreliert und nicht korreliert, sowie einen gemessenen technischen Anteil. Die Effektivwerte des neuronalen und des technischen Rauschen waren gleich groß. Das Rauschniveau wurde für jeden Datensatz um den Faktor $\sqrt{2}$ bzw. 3 dB erhöht. Die Abtastrate betrug 20 kHz. Die Zeitpunkte des Auftretens der Aktionspotentialen waren für die vier Datensätze identisch. Basierend auf dem Abschnitt 6.3.2 und in Anlehnung an die aktuellen FPGA-Implementierung wurde für die *Wavelet*-Filterung eine db2-DWT mit jeweils 128 *Samples* bei periodischer Erweiterung berechnet.

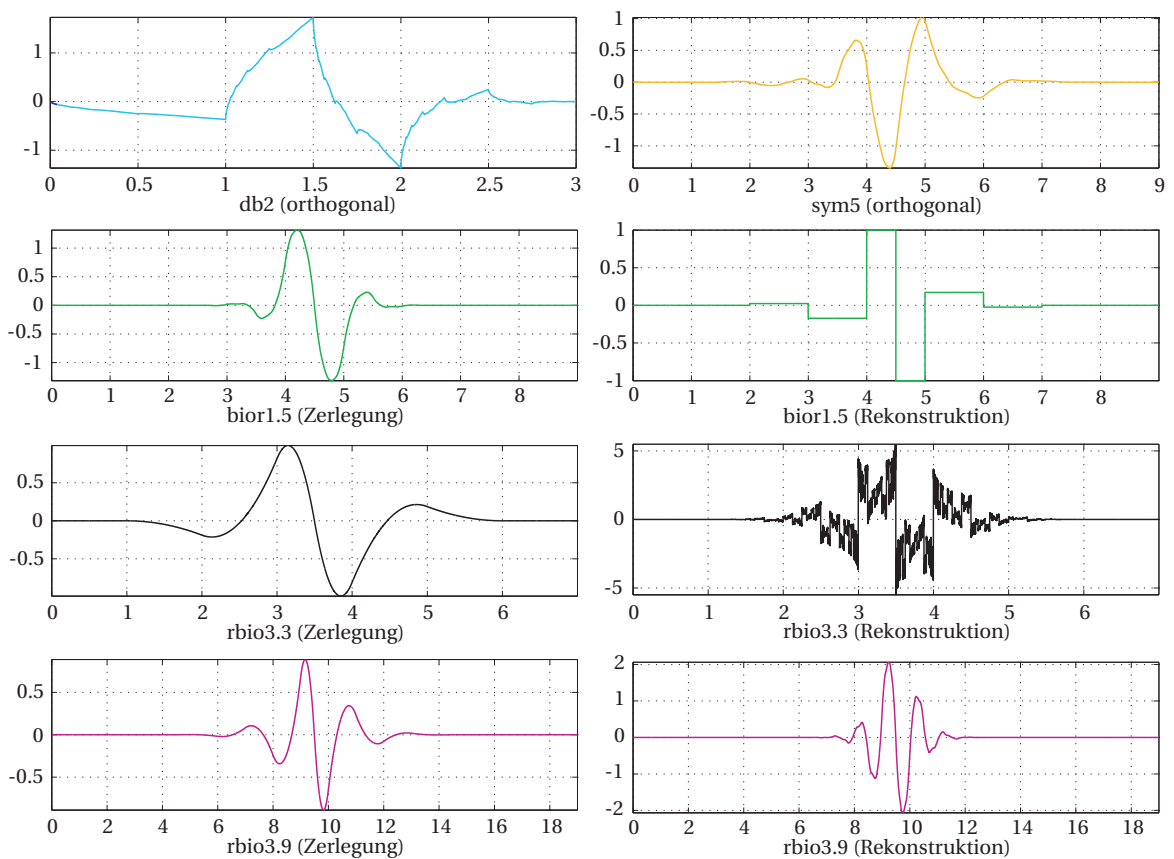
Es wurde aber eine sechsstufige Signalzerlegung durchgeführt, um bei der zusätzlichen Hochpassfilterung eine geringere Signalformänderung zu erreichen. Nach der Zerlegung wurde mittels d3-Band das globale Rauschen des neuronalen Signals abgeschätzt und mit der Schwelle $\hat{\sigma}_{d3} \sqrt{2 \log_e(n)}$ sowie *Soft-Thresholding* in allen Detailbändern unterdrückt. Bei der gewählten Abtastfrequenz erfolgte diese Rauschschätzung etwa von 1,25 kHz bis 2,5 kHz und wurde von der analogen Signalkonditionierung des BISC 02 und der neuronalen Zellaktivität relativ wenig beeinträchtigt. Diese Schätzung lieferte auch bei relativ kurzen DWT-Datenfenstern stabile Ergebnisse. Die Hochpassfilterung wurde über das Löschen des größten Approximationsbandes erreicht. Nach der Signalrekonstruktion erfolgt eine Extraktion von Aktionspotentialen mit der Schwelle $-4 \cdot \hat{\sigma}_{d3}$ ähnlich [163, 277]. Bei einer Detektion werden jeweils 22 *Samples* vor und 32 *Samples* nach der Triggerung gespeichert, was bei $F_S = 20$ kHz einem 2,7 ms langen Vektor entspricht. Die Detektionsschwelle wird über 64 DWT-Fenster gemittelt.

Ein *Spike* wurde erkannt, wenn ein Abtastwert die negative Detektionsschwelle unterschritt und seine drei Vorgänger und Nachfolger immer noch unterhalb von $-\hat{\sigma}_{d3}$ lagen. Diese zusätzliche Forderung war notwendig, um Artefakte aufgrund der periodischen DWT-Erweiterung weitgehend von der Detektion auszuschließen. Der Mindestabstand zweier aufeinander folgender *Spikes* musste 80 % der *Spike*-Länge, also ca. 2,2 ms betragen, um noch eine Zuordnung gewährleisten zu können. In Anlehnung an [163, 277] wurde ein Aktionspotential richtig erkannt, wenn der Detektionszeitpunkt maximal 1 ms vom Zeitpunkt des intrazellulären *Target Peak* entfernt lag. Andernfalls wurde ein *Target Spike* nicht detektiert bzw. Rauschen o. Ä. fälschlich als Aktionspotential interpretiert. Die Tabelle 6.6 enthält eine Übersicht der erzielten Ergebnisse. Bei den gewählten SNR, den *Spike Templates* und dem DWT-Modus eignen sich die verwendeten *Wavelets* unterschiedlich gut zur Signalfilterung. Diese Konditionierung beeinflusste auch die Detektion.

Im Vergleich zur *offline* Detektion von Aktionspotentialen nach [163, 277] können mit einer geeigneten *Wavelet*-Wahl ähnlich gute oder bei kleinem Signalrauschabstand auch bes-



(a) Synthetisierte rauschfreie, extrazelluläre Spikes zweier Units



(b) Für die Signalkonditionierung genutzte *Mother Wavelets*

Abbildung 6.9: Gegenüberstellung von synthetisierten, zunächst noch rauschfreien Aktionspotentialen und einer Auswahl von *Wavelets*, die zur Rauschunterdrückung eingesetzt werden könnten. Es wurden die orthogonalen Daubechies db2 und *Symlet* sym5 *Wavelet*-Funktionen dargestellt. Des Weiteren wurden die *Wavelet*-Funktionen für die Signalzerlegung bzw. -rekonstruktion des biorthogonalen *Spline Wavelet* bior1.5 und *Reverse Spline Wavelet* rbio3.3 und rbio3.9 abgebildet. Die gewählten Maßeinheiten sind aufgrund der Skalierung willkürlich.

Signalqualität	DSV	Zuordnung <i>Spikes</i> nach der Detektion			
		<i>Unit 1</i>	<i>Unit 2</i>	Vermisst	Eingefügt
Rauschfrei	–	465	586	51	0
SNR = 4,6	db2	468	576	58	13
	sym5	465	568	69	41
	bior1.5	463	580	59	0
	rbio3.3	418	531	153	201
	rbio3.9	460	555	87	72
	Smith et al.	433	548	121	69
SNR = 3,2	db2	462	581	59	10
	sym5	468	578	56	14
	bior1.5	448	575	79	0
	rbio3.3	425	562	115	111
	rbio3.9	458	573	71	53
	Smith et al.	466	564	72	8
SNR = 2,3	db2	454	578	70	9
	sym5	457	575	70	14
	bior1.5	416	559	127	3
	rbio3.3	407	558	137	66
	rbio3.9	451	578	73	34
	Smith et al.	459	561	82	36
SNR = 1,6	db2	343	520	239	23
	sym5	395	553	154	15
	bior1.5	194	309	599	0
	rbio3.3	285	390	427	23
	rbio3.9	392	532	178	13
	Smith et al.	36	402	664	2

Tabelle 6.6: Die *Spike*-Detektion wurden an vier synth. MEA-Datensätze mit verschiedenen Signalrauschabständen aber identischem *Timing* getestet, 2 *Units* mit 494 bzw. 608 *Spikes*, $F_S = 20$ kHz, Länge 30 s. Korreliertes, nicht korreliertes und technisches Rauschen wurde berücksichtigt. Die Filterung und Rauschunterdrückung erfolgte *Wavelet*-basiert. Die *Spikes* wurden mit der Schwelle $-4\hat{\sigma}_{d3}$ detektiert. Die Anzahlen der korrekt detektierten, der vermissten sowie von zusätzlich erfassten *Spikes* sind angegeben. Überlagerungen von Aktionspotentialen beider *Units* verhindern bereits im rauschfreien Signal die Detektion von 51 der insgesamt 1102 *Spikes*, *Wavelet*-Bezeichnung gemäß MATLAB®. Zum Vergleich eine Detektion gemäß Smith et al. [163, 277]: *offline* Filterung mit Butterworth-Bandpass vierter Ordnung 300 Hz–6 kHz, allerdings Detektion mit negativer Schwelle $-4 \cdot \text{median}(|\text{Signal}|/0,6745)$ zur besseren Vergleichbarkeit.

sere Detektionsergebnisse erreicht werden. Die alternative *offline* Verarbeitung wurde an zusätzlich generierten Daten getestet. Diese MEA-Datensätze weisen das gleiche *Spike Timing* und SNR aber eine andere Rauschzusammensetzung auf. Anstelle des gemessenen Sensorrauschens wurde Gauß-verteilt, weißes Rauschen hinzugefügt. Die Effektivwerte des neuronalen und des Gauß-Rauschens sind erneut gleich groß. Das Gesamtsignal wurde anschließend im Bereich von 300 Hz bis 6 kHz Bandpass gefiltert. Es besitzt im Vergleich zum synthetisierten BISC-Signal eine größere Bandbreite, welche sich auch auf die Höhe der berechneten Detektionsschwelle auswirkt. Das *Wavelet*-basierte Filterergebnis ist abhängig vom Grad der Übereinstimmung von *Wavelet* und Aktionspotential. Untersuchungen, wie z. B. [299], legen nahe, dass sich bei anderen *Spike*-Formen u. U. andere *Wavelets* besser zur Transformation eignen werden.

$$p(s, t) = \frac{C(s, t)}{\sqrt{C(s, s)C(t, t)}} \quad \text{mit } C = \text{cov}(X) \quad (6.31)$$

$$p_{st}(m) = \begin{cases} \sum_{n=0}^{N-|m|-1} \left(s(n+m) - \frac{1}{N} \sum_{i=0}^{N-1} s_i \right) \left(t_n^* - \frac{1}{N} \sum_{i=0}^{N-1} t_i^* \right) & m \geq 0 \\ p_{ts}^*(-m) & m < 0 \end{cases} \quad (6.32)$$

$$\hat{P}_{st}(m) = \begin{cases} \sum_{n=0}^{N-m-1} s(n+m) t_n^* & m \geq 0 \\ \hat{P}_{ts}^*(-m) & m < 0 \end{cases} \quad (6.33)$$

Nach der Detektion von Aktionspotentialen erfolgte eine Klassifikation mittels korrelationsbasierter Ansätze. Zunächst wurde der Korrelationskoeffizient $p(s, t)$ gemäß Gleichung 6.31 berechnet, d. h. es wurde die normierte Ähnlichkeit zwischen *Spike S* und *Template T* ohne Lageveränderung ermittelt. Weiterhin wurde mit Gleichung 6.32 die Kreuzkovarianz zwischen *S* und *T* für die Signallänge *N* berechnet. Es erfolgte dabei eine Normierung dieser Sequenz, sodass die Autokovarianzen bei Verschiebung Null den Wert eins annahmen. Dies kann als Berechnung des Korrelationskoeffizienten bei einer schrittweisen Änderung der Signallage aufgefasst werden. Schließlich wurde die Kreuzkorrelationsfunktion zwischen *T* und *S* analog Gleichung 6.33 ermittelt. Es wurde aber auf zwei unterschiedlichen Wegen normiert. Bei der Berechnung von $\hat{P}_{st}(m)$ wurde auf eine Normierung verzichtet. Während $\tilde{P}_{st}(m)$ so normiert wurde, dass die Autokorrelationsfunktionen bei Verschiebung null den Wert eins ergaben. Bei den lageabhängigen Ähnlichkeitsbestimmungen wurde jeweils das Maximum der Übereinstimmung ausgewertet.

Der Klassifikationserfolg, also die Güte der Klassifikation, wurde gemäß [277] bewertet. In dieser Veröffentlichung wird das Maß FoM (*Figure of Merit*) gemäß Gleichung 6.34 definiert. N_j entspricht der *Spike*-Anzahl von Neuron *j*, *n* gibt die Anzahl der *Units* an, hier zwei. Schließlich gibt $T_j(i)$ Auskunft über die Zahl der *Spikes* von Neuron *j* in Cluster *i*. FoM gibt also an, wie gut die erkannten Cluster den vorhandenen *Units* entsprechen. Dieses Maß erreicht die Größe eins, wenn sich alle *Spikes* einer *Unit* in genau einem Cluster wiederfinden. Die Reihenfolge der Cluster ist dabei egal. Es werden aber Nicht- und

Signalqualität	DSV	FoM	FK	NK
Rauschfrei	$p(s, t)$	0,1	465	0
	$p_{st}(m)$	0,99	4	0
	$\hat{P}_{st}(m)$	0,99	5	0
	$\tilde{P}_{st}(m)$	0,99	4	0
SNR = 4,6	$p(s, t)$	0,09	314	307
	$p_{st}(m)$	0,94	31	0
	$\hat{P}_{st}(m)$	0,61	203	0
	$\tilde{P}_{st}(m)$	0,92	41	0
	Smith 1	0,91	–	–
SNR = 3,2	$p(s, t)$	0,07	288	388
	$p_{st}(m)$	0,87	69	0
	$\hat{P}_{st}(m)$	0,44	288	0
	$\tilde{P}_{st}(m)$	0,9	54	0
	Smith 1	0,86	–	–
SNR = 2,3	$p(s, t)$	0,02	382	246
	$p_{st}(m)$	0,44	283	0
	$\hat{P}_{st}(m)$	0,77	117	0
	$\tilde{P}_{st}(m)$	0,5	255	0
	Smith 1	0,56	–	–
SNR = 1,6	$p(s, t)$	0,21	271	102
	$p_{st}(m)$	0,6	165	0
	$\hat{P}_{st}(m)$	0,7	126	0
	$\tilde{P}_{st}(m)$	0,67	138	0
	Smith 1	0,19	–	–

Tabelle 6.7: Ausgehend von den erzielten Detektionsergebnissen bei vorheriger Rauschunterdrückung mittels db2-Wavelet in Tabelle 6.6 wurde die Wirksamkeit unterschiedlicher Klassifikationsansätze ausgewertet. Für die einzelnen Verfahren wurden jeweils die Klassifikationsgüte (*Figure of Merit*) sowie die Anzahlen der fehlklassifizierten (FK) und der nicht klassifizierten (NK) *Spikes* bei verschiedenen Signalausabständen erfasst. Alle synthetisierten MEA-Datensätze besaßen ein identisches *Timing* sowie zwei *Units* mit insgesamt 1102 Aktionspotentialen. Zum Vergleich wurden die FoMs eines nicht überwachten Verfahrens nach [277] angegeben.

Fehlklassifikationen berücksichtigt. Die *Templates* für die Klassifizierung wurden manuell dem gefilterten Signal entnommen. Diese Bibliothek an Modell-*Spikes* wurden während der Klassifikation nicht aktualisiert bzw. ergänzt. Ein detektiertes Aktionspotential wurde der Klasse zugewiesen, die die größte Ähnlichkeit zu diesem *Spike* aufwies. Zusätzlich wurde bei den normierten Verfahren für eine erfolgreiche Zuordnung mindestens eine Korrelationsstärke von 0,5 gefordert. Diese Größe steht laut [404] für eine schwache Korrelation. Bei Nichterreichen dieses Wertes wurde die Kurvenform der Rauschkategorie zugeordnet.

$$FoM = \frac{1}{n} \sum_{j=1}^n \left(\frac{\max_i \left[T_j(i) - \sum_{k=1, k \neq j}^n T_k(i) \right]}{N_j} \right) \quad (6.34)$$

Die Klassifikationsergebnisse sind in Tabelle 6.7 zusammengefasst. Die Güte der Klassifikation variiert in Abhängigkeit des Verfahrens und der Signalqualität deutlich. Man kann bereits beim völlig rauschfreien Signal erkennen, dass die Lage von *Spike* und *Templates* bei der Form-basierten Klassifizierung berücksichtigt werden muss. Eine Detektion mit Amplitudenschwelle kann zu Signalverschiebungen führen, da der „relative“ Detektionszeitpunkt nicht nur von der Schwellenhöhe sondern auch vom konkreten Kurvenverlauf des Aktionspotentials abhängt. Eine nachträgliche Ausrichtung, auch *Alignment*, kann daher sinnvoll sein. Dies geschieht bei der Berechnung der normierten Kreuzkovarianz und der Kreuzkorrelation, sodass hier nahezu ideale Ergebnisse erzielt werden können. Mit kleiner werdendem Signalrauschverhältnis nimmt der Klassifikationserfolg wie erwartet ab. Die [277] entnommenen Klassifikationsergebnisse (*Smith 1*) in der Tabelle sollen nur als Anhaltspunkte dienen. Sie wurden mit dem nicht überwachten Verfahren *KlustaKwik*, siehe Abschnitt 3.2.6, und den ersten drei Hauptkomponenten erzielt. Ein direkter Vergleich erscheint deshalb nicht sinnvoll.

6.3.5 Fazit

Das ursprünglich angestrebte Ziel einer automatisierten Signalauswertung konnte nur ansatzweise erreicht werden. Verschiedene Fragestellungen erfordern weiterführende Untersuchungen. Die Entwicklung eines allgemein einsetzbaren Verfahrens zur Datenauswertung wurde zugunsten einer maßgeschneiderten Lösung für den vorgestellten Sensorprototypen aufgegeben. Für andere Sensoren kann sich daher die Notwendigkeit der Anpassung der hier vorgestellten Verfahren ergeben. Die Betrachtungen dieser Arbeit belegten die Wichtigkeit von relevanten *Templates* für die Klassifizierung. Eine Dichteuntersuchung im mehrdimensionalen Merkmalsraum erscheint in Bezug auf eine automatisierte *Template*-Generation interessant. Die Detektion von Aktionspotentialen ist in rauscharmen Signalen problemlos möglich. Ein *Wavelet*-basierter Filteransatz kann zur Rauschunterdrückung wirkungsvoll eingesetzt werden. Schließlich können Korrelationsverfahren zur *Unit*-Separation eingesetzt werden.

Das Synthesewerkzeug nach [277] ist aber nicht in der Lage, *Bursts* zu simulieren. Weitere Untersuchungen zur Bewertung der Korrelationsverfahren scheinen deshalb erforderlich, da sich die Amplitude und die Form von *Spikes* einer *Unit* bei erhöhter Aktivität deutlich ändern können. Bezüglich der vorzugsweise nicht überwachten Auswahl möglicher *Mother Wavelets* für die Filterung besteht Optimierungspotential. Gleiches gilt für die Auswahl von für die Rauschabschätzung geeigneter *Wavelet*-Skalen. Auch in [405] wird das Problem der Signalbandbegrenzung und der dann notwendigen Modifikationen der *Wavelet*-basierten Rauschunterdrückung beschrieben, wobei $\hat{\sigma}$ mittels QQ-Plot *offline* geschätzt wird. Generell ist speziell das *d1* Band für die Rauschabschätzung geeignet, da besonders hier die Schätzung unabhängig von der *Spike Rate* ist.

Aus diesem Grund wird in einer weiteren Veröffentlichung das neuronale Signal nur Hochpass-gefiltert. Es wird auch auf die notwendige Ähnlichkeit zwischen *Mother Wavelet* und zu untersuchenden Aktionspotentialen hingewiesen [406]. In [298] wird das neuronale Signal aus gleichem Grund über ein relativ weites Frequenzband verstärkt, was auch hier das *Denoising* über *d1* ermöglicht. Beim Neurosensorchip BISC 02 müsste zu diesem Zweck die Grenzfrequenz der *on chip* Filter erhöht werden. Das in Abschnitt 6.3.4 vorgestellte Filterverfahren löscht die Bänder *d1* bis *d3* aufgrund des *Denoising* weitgehend. Daher könnte man zur Vereinfachung der Berechnung diese Skalen komplett löschen. Wird eine stärkere Signalformänderung akzeptiert, kann aus ähnlichem Grund auf die sechste Zerlegungsstufe der *Wavelet*-Transformation verzichtet werden.

Allerdings wird in [407] auf die Wichtigkeit der Formerhaltung der *Spikes* für die weitere Clusterung und Klassifizierung hingewiesen und die Überlegenheit von *Wavelet*-Ansätzen im Vergleich zu IIR-Filtern hervorgehoben. Wie gezeigt können durch die abschnittsweise *Wavelet*-Filterung von kontinuierlichen Daten Artefakte entstehen. Zwei phasenverschobene Verarbeitungseinheiten könnten in diesem Zusammenhang sicherstellen, dass die auszuwertenden *Spikes* sich nur im Zentrum des Fensters befinden [408]. Schließlich könnte bei vorheriger Zentrierung von *Spikes* und *Templates*, z. B. auf das erste Extrem, die Berechnung der Korrelationsfunktion vereinfacht werden, da dann die Signalverschiebung entfallen könnte. Prinzipiell ist weiterhin die Frage zu klären, welche alternativen Merkmale eines Aktionspotentials, außer Form und Amplitude, zur Klassifikation genutzt werden könnten.

7 Biologische Messungen

7.1 Chipvorbereitung und Zellpräparation

Die von der Micronas GmbH hergestellten und in einem CLCC-*Package* aufgebauten sowie gebondeten Chips wurden zunächst verkapselt. Dazu wurde auf das *Package* ein Trog aufgebracht, der die Zellkultur während der Präparation und der Messung aufnahm. Dieses Formteil dichtete die Zellkultur auch gegenüber den *Bond*-Anschlüssen ab. Die aus PM-MA (Polymethylmethacrylat) bzw. POM (Polyoxymethylen weiß) hergestellten Tröge wurden dabei mit dem Silikonkleber DC 96-083 der Firma *Dow Corning* [409] direkt auf das Silizium geklebt. Anschließend wurden diese Chips bei 100 °C für zwei Stunden erwärmt, um den Kleber auszuhärten. Nach einem erfolgreichen Funktionstest gelangten diese Chips in die Zellpräparation [410].

Die primären neuronalen und Glia-Zellen wurden aus dem frontalen Cortex embryonaler NMRI (*Naval Medical Research Institute, Outbreed White Mice Stem*)-Mäuse gewonnen. Die Präparation des Cortex-Gewebes erfolgte unter sterilen Bedingungen in einem D1SGH-Puffer. Die Gewebefragmente wurden mechanisch sowie enzymatisch zerkleinert. Anschließend wurde diese Fragmente in DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) unter Zugabe von 10 % Rinderserum, 10 % Pferdeserum sowie von 1 % L-Glutamin weiter vereinzelt. Zur Vermeidung der Gliazellvermehrung wurden den Kulturen auf dem Chip in Abhängigkeit der Zellkonzentration 100 µl DMEM-Lösung mit weiteren Zusätzen zugegeben [10].

Zur Entsorgung der Stoffwechselprodukte wurde dreimal pro Woche die Hälfte des Mediums jeder Zellkultur eines Chips mit frischer, vorgewärmter DMEM-Lösung ersetzt. Die Kulturen wurden für 30 Tage bei 37 °C und 10 % CO₂ (Kohlendioxid) aufbewahrt. Nach etwa vier Wochen gelten diese neuronalen Zellkulturen als ausgereift und können für Experimente genutzt werden [10]. Die Präparation der primären Herzmuskelzellen embryonaler Mäuse erfolgte in einer weitgehend identischen Vorgehensweise. Als Medium kam allerdings *Ham's F12* zur Anwendung. Zudem konnten bereits nach etwa vier bis fünf Tagen in Kultur die Messungen an den präparierten Chips beginnen.

Die Chips wurden vor der Aussaat der Zellen mit Trypsin und Contrad[®]70 gesäubert und anschließend mit deionisiertem Wasser gespült. Danach erfolgt eine Sterilisierung der Chips in einem Autoklaven. Die aktive Oberfläche des Neurosensorchips wurde hydrophilisiert und daraufhin erneut mit deionisiertem Wasser gespült. Eine Beschichtung der Chipoberfläche mit 30 µl Poly-D-Lysin und 30 µl Laminin sicherte die Anhaftung der Zellkultur auf dem Mikrosensor [10, 89].

7.2 Messaufbau, Datenerfassung und Archivierung

Bei den Messungen an HMZ (Herzmuskelzellen) und Neuronen kam der in Kapitel 5 beschriebene Messaufbau zum Einsatz. Er bestand aus dem Silizium-basierten Sensorchip BISC 02, dem externen Neuromessadapter, einem FPGA-USB-Modul zur Vorverarbeitung und zum Transfer der Messsignale, einer Temperaturregelung, einer pH-Pufferung des Mediums mittels CO₂-Begasung, einer Ag/AgCl (Silber/Silberchlorid)-Referenzelektrode und einer Spannungsversorgung des Systems. Ein ähnlicher Aufbau, allerdings ohne Auswertelektronik, wurde auch beim Vorgängerchip des CMOS-Sensors BISC 02 eingesetzt [411]. Bei den Zellmessungen wurden ausschließlich die Elektroden des Multielektrodenarray des Sensors verwendet, deren Signale über RC-Hochpässe ausgekoppelt und anschließend *on chip* verstärkt sowie Tiefpass gefiltert wurden.

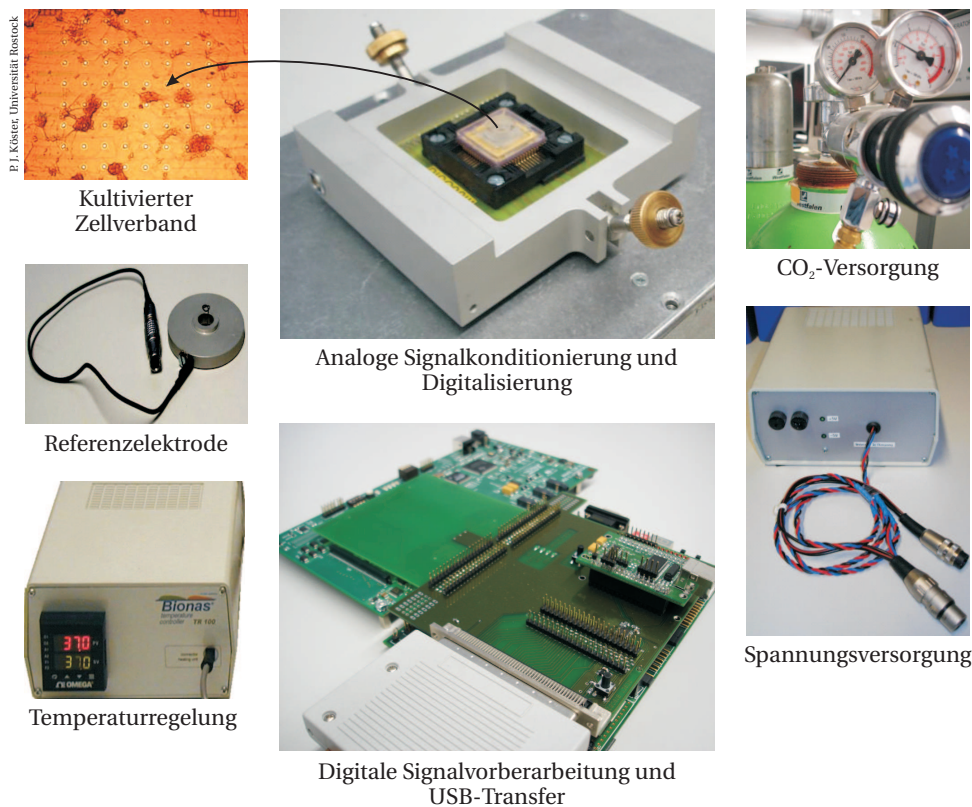


Abbildung 7.1: Aufbau des verwendeten Sensorsystems

Zeitgleich wurden acht der insgesamt 64 Elektrodensignale per Zeitmultiplex-Betrieb vom Sensorchip ausgegeben und mit externer *Hardware* weiterverarbeitet. In Abhängigkeit der erfassten Signalstärke wurde eine bis zu zweihundertfache Verstärkung auf dem Sensorchip genutzt. Die *on chip* Tiefpassfilter zweiter Ordnung besaßen eine Grenzfrequenz von 5 kHz. Die für die Digitalisierung der MEA-Signale verwendete Abtastfrequenz von 20 kHz bzw. 33,3 kHz erforderte jeweils eine Umschaltfrequenz der insgesamt acht Multiplexer des Sensors von 160 kHz und 267 kHz respektive. Dieses Taktsignal wurde vom FPGA-Modul bereitgestellt und extern an den Sensorchip angelegt [412, 413].

Mittels Neuromessadapter wurde der Sensorchip angesteuert und ausgelesen. Die vom Chip bereitgestellten MEA-Signale wurden zunächst Impedanz gewandelt, extern zusätzlich elffach verstärkt sowie in ihrer Symmetrie an die nachfolgenden AD-Wandler des NMA angepasst. Mit dem NMA wurden gleichzeitig acht analoge Elektrodensignale wahlweise mit einer Auflösung von 12 Bit bzw. 14 Bit digitalisiert. Diese Abtastwerte wurden sowohl nach einer *Spike*-Detektion als auch bei der kontinuierlichen Archivierung als 16 Bit-Festkommawerte per USB 2.0 auf einen Messrechner übertragen. Deshalb ergeben sich bei der fortlaufenden Datenübertragung und einer Abtastung von 20 kHz bzw. 33,3 kHz pro Sensorchip eine Übertragungsrate von ca. $2,4 \text{ MByte/s}$ bzw. von ca. $4,1 \text{ MByte/s}$.

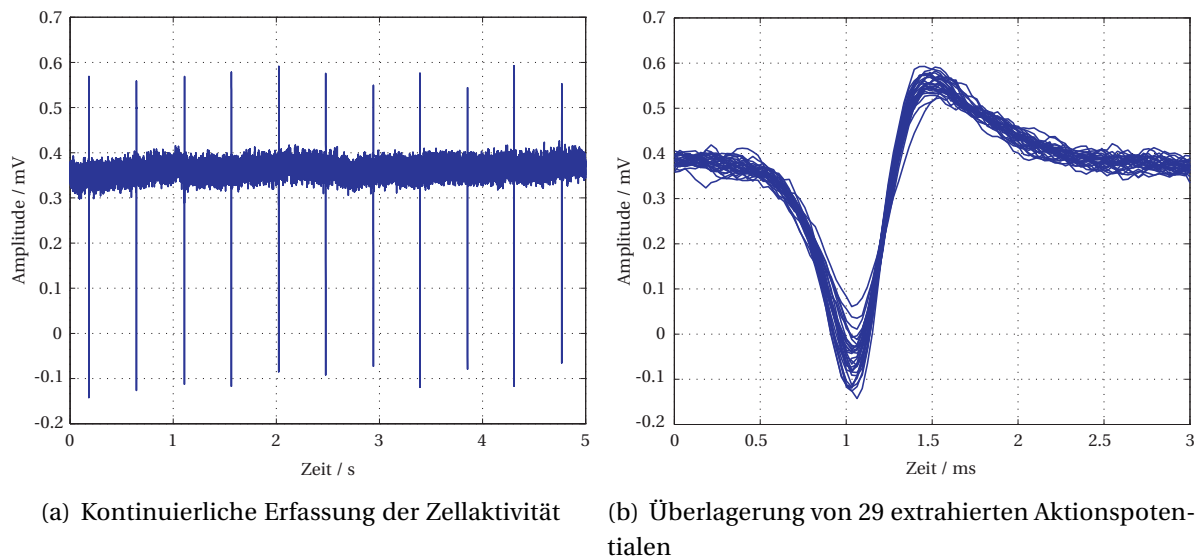


Abbildung 7.2: Messung an Herzmuskelzellen mit dem Chip YAB1 35

Bei einer kontinuierlichen Datenübertragung wurden jeweils Blöcke mit 64 mal 128 Werten und zusätzlichen Zeitstempeln sowie Blocknummern auf den Computer übertragen und dort im DDT (*Continuously Digitized Data*)-Format der Firma *Plexon Inc.*, USA, abgespeichert. Die während einer *Spike*-Detektion detektierten Signale wurden unabhängig von der gewählten Abtastrate mit jeweils 32 Abtastwerten pro Kurvenform erfasst und mit Zeitstempel, Kanalnummer und Rauschniveau versehen. Diese dann auf den Messrechner transferierten Daten wurden dort in das Plexon konforme PLX-Format konvertiert und gespeichert. Die Datenanalyse erfolgte mit der *Software Plexon Offline Sorter*. Im Abschnitt 5.3.1 wird die Aufbereitung und Übertragung der Sensordaten detailliert beschrieben.

In mehreren Untersuchungen wurde die elektrische Aktivität von Herzmuskelzellen mit den MEA-Elektroden des BISC 02 erfolgreich gemessen. Dabei wurden vorwiegend Zellaggregate auf dem Sensorchip kultiviert. Die bei den HMZ-Experimenten erfassten Potentiale wiesen dabei Amplituden zwischen 0,5 mV und 1,2 mV und eine Wiederholrate zwischen 1,5 Hz und 2,8 Hz auf, siehe auch Abbildung 7.2. Diese Ergebnisse stimmen gut mit Veröffentlichungen anderer Forschergruppen überein [414–416]. Im Rahmen dieser Messungen konnten einzelne Sensorchips in Ergänzung zum ursprünglichen Projektziel auch mehrfach für die Zellkultur und die verschiedenen Messkampagnen wiederverwendet werden.

Aufbauend auf diesen Ergebnissen wurden in einer weiteren Messreihe neuronale Netzwerke mit dem BISC 02 untersucht. Die im Vergleich zu Herzmuskelzellen deutlich längere Kulturzeit der Neuronen stellte besonders in Bezug auf die Verkapselung und die Chippassivierung erhöhte Anforderungen an den BISC 02. Aufgrund dieser mechanischen sowie elektrischen Probleme wurde die Chipansteuerung und das Auslesen der Messdaten erschwert. Eine elektrische neuronale Zellaktivität konnte deshalb nicht gemessen werden. Die Wiederholung einer solchen Messung war während dieses Projektes aus zeitlichen Gründen nicht mehr möglich.

Dennoch konnte mit den Experimenten an Herzmuskelzellen unter realistischen Bedingungen das Funktionieren des Sensorchips BISC 02 und seiner externen *Hardware* nachgewiesen werden. Gleichzeitig wurde hinsichtlich der Chipstabilität und der Datenverarbeitung Optimierungspotential aufgezeigt. Eine Überarbeitung des vorliegenden Prototypen eines *Cell Monitoring System* auch unter Beachtung der Resultate aus dem Abschnitte 5.1.3 und dem Abschnitt 6.3 wird eine umfassendere Nutzung des vorliegenden Sensorchips auf Siliziumbasis ermöglichen.

8 Zusammenfassung

8.1 Elektronik-Konzept

8.1.1 Sensorchip

Der CMOS-Sensorchip BISC 02 umfasst 68 in einem MEA angeordnete Palladium-Elektroden, 14 CPFET und 2 ISFET. Jeweils 64 dieser MEA-Elektroden sind mit je einem Verstärker und einem nachfolgenden Filter direkt auf dem Chip verbunden, wodurch der herkömmliche Messaufbau deutlich vereinfacht werden kann. Nach dieser Signalkonditionierung werden mit insgesamt acht *on chip* Multiplexern und *Pad*-Treibern zeitgleich acht dieser Elektrodensignale vom Chip ausgegeben. Jede dieser 64 Elektroden besitzt eine Schaltergruppe auf dem Chip, welche eine individuelle Konfiguration des Signalweges ermöglicht. Neben der unterschiedlichen Signalkopplung ermöglichen diese Schaltergruppen auch die Auswahl beliebiger Elektroden für die Netzwerkstimulation. In dem NMA lassen sich zudem externe Elektronikbaugruppen zur Ansteuerung der FETs des Sensorchips zuschalten. Die Signale der 64 MEA-Elektroden können in Stufen bis zu vierhundertfach *on chip* verstärkt werden. Der externe NMA verstärkt diese Signale vor der Digitalisierung zusätzlich elffach.

Zusammen mit einer RC-Kopplung und der anschließenden Tiefpassfilterung lassen sich die Elektrodensignale des MEA von ca. 200 Hz bis maximal 5 kHz in ihrer Bandbreite begrenzen. Der dem MUX nachfolgende *Pad*-Treiber gestattet eine maximal mögliche Abtastrate von rund 47 kHz pro Elektrode. Durch eine Verringerung der Anzahl der ausgegebenen Elektrodensignale kann die Abtastrate für die verbleibenden MEA-Signale weiter erhöht werden. Die Leistungsaufnahme des Sensors von maximal 570 mW kann mit einer Verringerung des *Bias* reduziert werden. Mittels Platin-Beschichtung konnte die Impedanz der MEA-Elektroden um eine Größenordnung reduziert werden. Dieses Ergebnis stimmt gut mit der Literatur überein [48, 84]. Allerdings besitzen die Elektroden des BISC 02 auch nach der Platin-Beschichtung eine im Vergleich zu anderen Arbeiten deutlich größere Impedanz.

Anhand der Literatur lässt sich auch zeigen, dass Aktionspotentiale von Herzmuskelzellen typischerweise Amplituden von $300 \mu\text{V}_{pp}$ bis $400 \mu\text{V}_{pp}$ besitzen. Die Dauer des biphasischen Signalanteils kann je nach Quellenlage zwischen 1 ms und 100 ms variieren. Bei der Datenerfassung konzentriert man sich hier meist auf einen Frequenzbereich von 1 Hz bis 3 kHz [74]. *Spikes* von neuronalen Zellkulturen der Maus können Amplituden von

50 μV_{pp} bis 200 μV_{pp} aufweisen. Die gewöhnlich biphasigen *Spikes* besitzen dabei eine Dauer von bis zu 1 ms [24]. Die Signalenergie von extrazellulär gemessenen Potentialen konzentriert sich im Frequenzbereich von 100 Hz bis 4 kHz [75]. Der Silizium-basierte Sensorchip BISC 02 ist somit gut für Messungen an elektrisch aktiven Herzmuskel- und Nervenzellen geeignet.

Insgesamt ermöglichen 138 I²C-Register die umfangreiche Konfiguration des Sensors. Neben der Veränderung der Signalwege und der Einstellung der Signalausgabe, der Variation der *Bias*-Einstellungen und der Realisierung der *Offset*-Kompensation für die aktiven Komponenten der Signalkonditionierung ermöglichen diese Register auch eine individuelle, in Stufen änderbare Signalverstärkung für 64 MEA-Elektroden. Während des Systemtests des Sensors wurden standardmäßig die MEA-Elektroden mit nachfolgender *on chip* Konditionierung und Multiplexausgabe genutzt, wobei die Elektrodensignale zur Vermeidung von Driften und Gleichanteilen über einen RC-Hochpass an die Sensorelektronik gekoppelt wurden. Die Tiefpassfilterung auf dem Chip diene neben der Bandbegrenzung des Rauschens auch der *Anti-Aliasing*-Filterung vor der Digitalisierung. Mittels analogen Testbusses konnten bestimmte Komponenten des Chips separat untersucht werden. Die Funktionalität der auf dem Chip befindlichen Feldeffekttransistoren wurde in Vorarbeiten überprüft. Diese Komponenten wurden beim weiteren Systemtest aber nicht verwendet.

Ein vergleichbarer CMOS-Sensorchip mit Multielektrodenarray und integrierter Signalaufbereitung wurde nur noch von der Hierlemann-Gruppe der ETH Zürich entwickelt. Die MEA-Signale können auf diesem Chip verstärkt, gefiltert und digitalisiert werden. Eine Zellstimulation ist ebenso möglich [269]. Der Sensorchip BISC 02 wurde aufbauend auf verschiedenen Vorentwicklungen der Gruppe um Baumann für die multiparametrische Untersuchung elektrisch aktiver Zellverbände innerhalb eines CMS[®] entworfen und realisiert. Dieser Chip besitzt deshalb eine vergleichsweise große Sensorvielfalt und eine Vielzahl von Betriebsmöglichkeiten. Seine Struktur ermöglicht dennoch einen kompakten Messaufbau. Der Sensor kann in Kooperation mit der Micronas GmbH industriell in gleich bleibend hoher Qualität und in der erforderlichen Stückzahl gefertigt werden. Eine zusätzlich realisierte externe *Hardware* gestattet die flexible Anbindung dieses Sensors an eine kompakte Elektronik zur Datenerfassung.

8.1.2 Externe *Hardware*

Die 64 konditionierten MEA-Signale des BISC 02 werden über Multiplexer und *Pad*-Treiber ausgegeben. Der externe Neuromessadapter ermöglicht eine zusätzliche Verstärkung dieser zuvor impedanzgewandelten Signale. Nach einer Signalanpassung und der AD-Wandlung können die Messdaten auf einem FPGA zwischengespeichert und gegebenenfalls bearbeitet werden. Der Neuromessadapter erlaubt zudem die Erfassung und Aufbereitung der verbleibenden vier direkten MEA-Elektrodensignale, die bei neurophysiologischen Messungen bisher noch nicht digitalisiert wurden. Eine Erweiterung des NMA zur Realisierung der Zellstimulation sowie zur Auswertung der Signale der ISFETs und der Temperaturdiode ist vor-

gesehen. In der aktuellen Ausbaustufe ermöglicht die externe Sensorumgebung somit eine Datenakquise von 64 der insgesamt 68 MEA-Elektroden des Sensors, welche mit maximal 33,3 kHz und einer Auflösung von bis zu 14 Bit abgetastet werden können.

Diese Messdaten können auf einem Computer gespeichert bzw. zusätzlich auf dem FPGA vorverarbeitet werden. Im *Streaming*-Modus werden die MEA-Signale mittels NMA digitalisiert, auf dem FPGA zwischengespeichert und anschließend per USB 2.0 im *Bulk*-Transfer kontinuierlich auf den Messrechner übertragen. Dort können klassische *offline* Algorithmen zur Analyse der Elektrodensignale herangezogen werden. Im Falle des *Spike*-Modus erfolgt auf dem FPGA eine fünfstufige Zerlegung der erfassten Sensordaten mittels diskreter *Wavelet*-Transformation und des *db2-Wavelets*. Nach der Bestimmung des Signalrauschens, einer einfachen Signalfilterung und der Rücktransformation in den Zeitbereich können auf dem FPGA Aktionspotentiale aus dem Messsignal extrahiert und mittels USB 2.0 auf einem Computer gespeichert werden.

Bereits früh wird für vergleichbare MEA-Anwendungen die Nutzung von externen Vorverarbeitungsmodulen vorgeschlagen und beschrieben [417, 418]. Mittels *Software* und externer *Hardware* sollte dabei eine Beschleunigung der Datenverarbeitung erzielt und der *Host* bei der Anwendung von Klassifikationsverfahren entlastet werden [241, 294, 419]. Zur effektiven Aufnahme von neuronalen Messdaten könnte speziell entwickelte *Hardware* auch aktuell noch erforderlich sein. Trotz bereits vorhandener, kommerzieller Alternativen kann eine solche *Hardware* in besonderer Weise den konkreten Bedingungen der neuronalen Datenakquise gerecht werden [420]. Eine derartige *Hardware* mit integrierter Signalverarbeitung kann die Bandbreite der zu übertragenden Daten deutlich reduzieren [421, 422]. Zukünftig ist zudem mit einer weiteren Erhöhung der Sensoranzahl zu rechnen.

Ein vergleichbarer Systemaufbau bestehend aus einem MEA-Sensor, einem FPGA sowie einer USB-Anbindung wird nur von der Hierlemann-Gruppe beschrieben. Mittels gleitendem Mittelwert und Varianz werden dort Datensegmente mit neuronaler Aktivität auf dem FPGA identifiziert und für eine spätere *Spike*-Detektion und *offline* Analyse auf einem PC übertragen [388]. Die alternative Anwendung des Ethernet-Protokolls zur Übertragung neuronaler Daten wird in [423] skizziert. Zur Ermöglichung einer ressourcenschonenden Datenakquise wurde für den BISC 02 eine kompakte *Hardware*-Umgebung mit integrierter Signalvorverarbeitung geschaffen. Neben der kontinuierlichen Datenerfassung gestattet sie die *Spike*-Detektion bereits auf einem FPGA-Modul und erlaubt so eine deutliche Begrenzung der zu transferierenden Datenmenge. Dieses laufzeitkritische Verfahren wurde *Hardware*-nah auf einem FPGA implementiert. Die realisierten *Hardware*-Komponenten und die Ansätze der Signalvorverarbeitung können modular erweitert werden, um eine Nutzung aller Sensortypen des BISC 02 zu ermöglichen. Mit diesem Prototypen des Messsystems konnte der „*Proof of Concept*“ erbracht werden.

8.1.3 Software-Konzept

Das vorgestellte *Software*-Konzept zur Übertragung und Archivierung der Sensordaten gestattet den kontinuierlichen bzw. abschnittswisen Datentransfer mittels USB 2.0 auf einen Messrechner. Mit der Detektion und Extraktion von potentiellen *Spikes* im kontinuierlichen Datenstrom kann die erforderliche Bandbreite für die Signalübertragung deutlich reduziert werden. Die in C/C++ geschriebene *Software* befindet sich noch im Prototypenstadium und kann gemeinsam mit der Ansteuerung des USB-Interfaces auf der Sensorseite weiter optimiert werden. Hier bietet sich z. B. auch die Nutzung modifizierter USB-Treiber an. Die geplante *online* Klassifikation wurde nicht in das Sensorsystem integriert. Die Untersuchungen zu formbasierten Klassifikationsansätzen erfolgten in MATLAB[®] und gestatteten so eine gründliche Untersuchung der Signalsynthese, der Detektion und der *Spike*-Zuordnung.

8.2 Signalverarbeitung

8.2.1 Detektion

Zunächst konnte in Simulationen bestätigt werden, dass mittels *Wavelet*-Transformation und anschließender Auswertung der Koeffizienten im $d1$ -Band die Standardabweichung σ von Gauß-verteilterm Rauschen in einem MEA-Signal gut abgeschätzt werden kann. Eine an die Schätzung $\hat{\sigma}$ gekoppelte Detektionsschwelle kann sich ohne *User*-Interaktion adaptiv an das Messsignal anpassen und ist prinzipiell zur Extraktion von Aktionspotentialen auch bei erhöhter Zellaktivität geeignet. Nach der Filterung und der Signalarücktransformation wurde diese Detektionsschwelle im Zeitbereich angewendet. In Simulationen wurden unterschiedliche *Wavelets* analysiert und das *db2-Wavelet* als ein Kompromiss bezüglich Aufwand und Signal-Rausch-Trennung für die Implementierung ausgewählt.

Diese *Spike*-Detektion wurde in *Handel-C*, später auch in VHDL, auf FPGAs implementiert. Dabei wurde das Elektrodensignal in einer fünfstufigen DWT zerlegt. Die DWT wurde mit Hilfe des *Lifting Scheme* umgesetzt. Sie kann so im Vergleich zu traditionellen Verfahren deutlich effizienter berechnet werden. Bei einer Schwelltriggerung werden 32 Abtastwerte um den Triggerzeitpunkt gespeichert und gemeinsam mit Zusatzinformationen per USB 2.0 auf einen PC übertragen. Diese Daten können mittels *offline* Verfahren analysiert werden. Weitere Analysen in MATLAB[®] belegten aber, dass aufgrund der Bandbegrenzung der Sensorsignale auf dem BISC 02 eine Anpassung des klassischen Donoho-Ansatzes zur Schätzung von $\hat{\sigma}$ erfolgen muss. Unter den Bedingungen des konkreten Sensorsystems sind die $d3$ -Detailkoeffizienten besser zur Rauschabschätzung geeignet. Andernfalls muss $\hat{\sigma}_{d1}$ mit einem Offset beaufschlagt werden.

Das von Donoho et al. entworfene Verfahren zur Abschätzung und zur Reduzierung des Rauschens eines Signals gehört inzwischen zu den Standardmethoden der *Wavelet*-basier-

ten Signalaufbereitung. Neben der Rauschunterdrückung [342] und der Klassifizierung von mehrkanaligen neuronalen Signalen [164] wird dieser Ansatz z. B. auch zur Analyse von EKG-Signalen verwendet [424]. Es kann hier allerdings zu Variationen der verwendeten *Wavelets* und der Schwellen kommen. Der Einsatz einer Schwelle für die effizienten *Spike*-Detektion kann besonders in kompakten, mehrkanaligen Sensorsystemen auch gegenwärtig vorteilhaft eingesetzt werden [425]. Allerdings kann bei der traditionellen Abschätzung des Hintergrundrauschens mittels Gesamtsignal die Schwellenhöhe für die Amplitudenbasierte Detektion von *Spikes* innerhalb von *Bursts* stark ansteigen [163].

Eine *Hardware*-nahe Implementierung von Verfahren auf einem FPGA ist in der Lage, die Signalverarbeitung aufgrund der erzielbaren Parallelisierung zu beschleunigen und kann so aufwändige Berechnungen von einem *Host* übernehmen [426]. Die Implementierung einer DWT auf einem FPGA kann prinzipiell mittels Festkomma- bzw. Fließkomma-Arithmetik erfolgen. Das Integer-Verfahren lässt sich einfacher realisieren und ist schneller in der Ausführung. Allerdings lässt sich das Ausgangssignal aufgrund der erforderlichen Quantisierungen nicht mehr perfekt rekonstruieren. Bei der Berechnung kann es zu Überläufen kommen. Eine Fließkomma-Implementierung würde aber im Vergleich dazu einen höheren *Hardware*-Aufwand erfordern. Zudem reduziert der größere Platzbedarf die Parallelisierbarkeit des Verfahrens [427]. Bei der Festkomma-Implementation einer *Lifting*-basierten DWT kann die Integrität des neuronalen Ausgangssignals weitgehend erhalten werden. Somit lassen sich die Vorzüge dieser Realisierung nutzen [428].

Die Signalzerlegung mittels *Wavelet*-Transformation wurde als Festkomma-Arithmetik implementiert, um eine einfachere und schnellere Ausführung zu ermöglichen. Auswirkungen dieser Implementierung z. B. hinsichtlich der reduzierten Genauigkeit aufgrund der Zweierkomplementdarstellung und möglicher Überläufe wurden noch nicht umfassend analysiert. Einige Messreihen scheinen allerdings auf entsprechende Probleme hinzudeuten. Die robustere Rauschabschätzung mittels Median und eine echte Rauschunterdrückung nach einer *Wavelet*-Zerlegung entsprechend Donoho et al. wurden bisher im Interesse einer einfachen Realisierung nicht implementiert. Eine zuverlässige Detektion von Aktionspotentialen könnte deshalb in rauschbehafteten Messungen beeinträchtigt sein. Aus Kapazitätsgründen wurde die *Spike*-Extraktion unabhängig von der Abtastrate auf 32 Abtastwerte begrenzt. Ein *Proof of Concept* war aber auch hier möglich. Die Implementierung kann für ein Nachfolgesystem problemlos optimiert werden.

8.2.2 *Template*-Generation

Die Clusterung gehört zu den Standardverfahren der Mustererkennung. So kann die PCA zur Merkmalsextraktion verwendet werden. Eine Dichteabschätzung der Hauptkomponenten kann zur Lokalisierung potentieller Cluster und zur Gewinnung von *Templates* für die nachfolgende Klassifizierung genutzt werden [365]. Diese Clusterung kann z. B. mit *K-Means* berechnet werden, wobei die Euklidische Distanz zumindest bei klar trennbaren Clustern problemlos als Ähnlichkeitsmaß eingesetzt werden kann. Eine zunehmende

Clusterüberlappung kann jedoch zu Fehlern führen [152]. Eine mehrfache Clusterung für unterschiedliche angenommene Clusteranzahlen kann daher sinnvoll sein. Die objektive Bewertung der erzielten Clusterqualität z. B. anhand des Abstandes der ermittelten Clusterzentren kann einen Hinweis auf den Erfolg der Clusterung geben [153]. Neben Ausreißern, der Dimensionalität der Cluster und der erforderlichen Datenmengen ist auch die Tatsache zu beachten, dass die ermittelte Klassenanzahl nicht notwendigerweise mit der Zahl der *Units* übereinstimmen muss [152]. Weitere Merkmale wie z. B. ISI können klären, ob das genutzte Clustermodell für den Datensatz Gültigkeit besitzt [210, 429].

8.2.2.1 Dichteuntersuchung im Musterraum

Basierend auf Arbeiten von [363] wurde ein Verfahren zur Dichteuntersuchung anhand der ersten drei Hauptkomponenten der Hauptkomponentenanalyse implementiert. Dabei wird die PCA von bereits detektierten Aktionspotentialen berechnet und pro *Spike* die ersten drei Komponenten dreidimensional abgetragen. Die entstehenden Punktwolken werden daraufhin in regelmäßige Volumina unterteilt und auf Regionen größerer Dichte untersucht. Die ermittelten Dichtezentren könnten anschließend als *Templates* für die Klassifikation genutzt werden. Die Hauptkomponentenanalyse von Aktionspotentialen ist ein traditioneller [155] aber immer noch gültiger Ansatz zur Untersuchung von neuronalen Daten [299, 303, 365, 367, 430]. Dichteuntersuchungen haben den Vorteil auch unregelmäßige Cluster erfassen zu können. Eine Kombination beider Verfahren bietet sich daher an [364, 366]. Neben dem Auffinden von globalen Dichtemaxima ist in weiteren Analysen noch eine Bewertung der Relevanz der ermittelten *Templates* nötig.

8.2.2.2 Koeffizienten der Wavelet-Transformation

Das Sensorsystem für den BISC 02 gestattet eine Signalzerlegung mittels DWT, um eine Rauschabschätzung und eine Filterung der Messsignale zu ermöglichen. Es lag nahe, diese *Wavelet*-Koeffizienten auch hinsichtlich ihrer Eignung für die Klassifizierung zu bewerten. Basierend auf verschiedenen Veröffentlichungen wurde untersucht, ob Koeffizienten zur optimalen Unterscheidung von Aktionspotentialen ohne *User*-Interaktion identifiziert werden können. Mehrere Mutter-*Wavelets* wurden auf die erzielbare Separierbarkeit der entstehenden Cluster hin analysiert. Für die Clusterung wurden zunächst die einfach zu implementierenden Verfahren *K-Means* und *Growing K-Means* implementiert, wobei die bekannten Probleme bei sich überlappenden Clustern auch hier beobachtet wurden. Die nicht überwachte SPC-Clusterung versprach in diesem Fall bessere Ergebnisse zu liefern. Da dieser Ansatz nur in kompilierter Form vorlag, konnte er jedoch nur eingeschränkt angepasst und verwendet werden. Dennoch konnte der Nachweis der prinzipiellen Klassifizierbarkeit von *Spikes* mittels *Wavelet*-Koeffizienten erbracht werden.

Es sind aber weitere Untersuchungen bezüglich der zu nutzenden *Wavelet*-Familien, der nicht überwachten Koeffizientenauswahl und der Clusterverfahren erforderlich. Die Ver-

wendung der *Wavelet*-Transformation zur Rauschunterdrückung, Kompression und Klassifizierung von neuronalen Signalen bzw. *Spike Trains* wird eingehend untersucht und vielfältig beschrieben [431–438]. Eine Kombination dieses Verfahren mit z. B. künstlichen neuronalen Netzen ist möglich [439]. Speziell bei der Klassifizierung neuronaler Daten ist die *Shift*-Varianz der DWT zu beachten [298], da die Energieverteilung der Koeffizienten mit der Phase des Eingangssignals variiert [440]. Die DWT lässt sich aber hinsichtlich dieser *Shift*-Varianz optimieren [441] und kann somit zur *Spike*-Klassifikation prinzipiell eingesetzt werden [196]. Koeffizienten mit einer hohen Varianz lassen sich ohne a priori Kenntnisse bestimmen. Dichtezentren im entstandenen Musterraum können identifiziert und als *Templates* genutzt werden.

8.2.2.3 Weitere Merkmale von Aktionspotentialen

Die Suche nach geeigneten Merkmalsvektoren zur effektiven Clusterung von Aktionspotentialen stellt eine wichtige Grundlage bei der Klassifizierung neuronaler Daten dar. Aus diesem Grund wurden in einer weiteren Untersuchung zusätzlich die Koeffizienten der Fourier-Reihe, der Kosinus-Transformation und erneut die Koeffizienten der *Wavelet*-Transformation hinsichtlich ihrer Eignung zur Klassifikation von *Spikes* analysiert. Entsprechende Koeffizienten wurden manuell ausgewählt und anschließend mit dem ressourcenschonenden *K-Means*-Verfahren in Cluster aufgeteilt. Zur Vermeidung der bekannten Probleme dieses Verfahrens erfolgte ein Mehrfachstart des Algorithmus mit geänderten Schwerpunktvektoren. In den Klassifikationsarbeiten zum Neuro-Projekt wurde hier erstmals die erzielte Clusterqualität mit Hilfe zweier Fehlermaße mathematisch bewertet. Darauf basierend wurde die jeweils optimale Clusterung zur Modellierung eines Klassifikators verwendet, welcher auch zur Klassifizierung nachfolgender Datensätze genutzt wurde.

Es zeigt sich, dass bestimmte Koeffizienten bei verschiedenen Messreihen unterschiedlich gut für die Klassifizierung geeignet sind. Schließlich wurde die Nutzung einer Kombination aus *Wavelet*- und Fourier-Reihenoeffizienten zur Clusterung empfohlen. Wie auch in den Abschnitten 8.2.2.1 und 8.2.2.2 wurde das erzielte Ergebnis der *Unit*-Separation von verschiedenen Glas-MEA-Messungen subjektiv bewertet. Die nicht überwachte Bestimmung der Clusterzahl in einem Datensatz stellt ein grundlegendes Problem dar und ist deshalb Gegenstand zahlreicher Untersuchungen [380, 442, 443]. Auch auf dem Gebiet der Klassifizierung neuronaler Daten ist die Notwendigkeit der objektiven Bewertung der erzielten Clusterergebnisse erkannt worden. Deshalb werden verschiedene Verfahren zur Einschätzung der Clusterqualität vorgeschlagen [182, 207, 444–446]. Diese Erkenntnisse sollten in zukünftige Untersuchungen mit einbezogen werden. Interessant ist eine ergänzende Untersuchung, welche auf [379] aufbaut. Sie bestimmt statistisch unabhängige *Spike*-Merkmale, die eine Datenauswertung effektiver gestalten könnten [382].

8.2.3 Klassifikation

Relativ frühzeitig wurde eine Automatisierung der Detektion und Klassifizierung von neuronalen Signalen angestrebt. Nach einer intensiven Konfiguration durch den Anwender konnten so neben der einfachen Erfassung der *Spike*-Amplitude auch z. B. zwei beliebige Abtastwerte [447] oder das Maximum und Minimum der Aktionspotentiale [448, 449] ausgewertet werden. Der zuletzt genannte Ansatz weist Ähnlichkeiten zum Verfahren der *Trigger Boxes* auf. In [189] versuchte man, herausragende Abtastwerte zur effektiven Clusterung von *Spikes* mit einer geringeren *User*-Interaktion zu bestimmen. Aufgrund der Einfachheit ihrer Realisierung sind Fensterdiskriminatoren bzw. *Trigger Boxes* trotz der erforderlichen manuellen Konfiguration oftmals immer noch Mittel der Wahl, wenn Aktionspotentiale *online* detektiert und klassifiziert werden müssen. Allerdings können sie bei größerem Rauschen nur mit Schwierigkeit platziert werden [289]. Eine Berücksichtigung von Kurvenformänderungen ist ebenso nicht möglich.

Weitgehend autonom arbeitende Ansätze zur Klassifikation von Aktionspotentialen besitzen deshalb auch vor dem Hintergrund der angestrebten *Screening*-Verfahren eine zunehmende Bedeutung [77, 176, 202, 450, 451]. Sinnvollerweise sollten aber vor der Entwicklung weiterer Klassifikationsansätze die vorhandenen Verfahren, siehe z. B. Abschnitt 3.2 und 3.3, unter definierten, objektiven Bedingungen hinsichtlich der erzielbaren Klassifikationsergebnisse, des Implementierungsaufwandes und der erforderlichen *User*-Interaktion verglichen werden. Neben der belastbaren Definition eines Signalrauschabstandes sollten dabei auch einheitliche Testdatensätze genutzt werden. Mit [277, 309, 452] existieren bereits Arbeiten, die die für Multielektrodenarrays typische Signalstruktur eingehend beschreiben und somit die Synthese von definierten neuronalen Testdaten auch unter Berücksichtigung eines realistischen Sensorrauschens ermöglichen.

8.2.3.1 Kreuzkorrelation

Nach einer Detektion von Aktionspotentialen in synthetisierten Datensätzen wurden in dieser Arbeit Korrelations-basierte Verfahren angewendet, um die extrahierten *Spikes* zu klassifizieren. Die bei dieser Klassifizierung genutzten *Templates* wurden zuvor manuell aus dem gefilterten Sensorsignal extrahiert und während der Signalzuordnung nicht aktualisiert oder ergänzt. Aufgrund der schwer reproduzierbaren Bedingungen einer MEA-Messung hatten sich bei eigenen früheren Untersuchungen vordefinierte Klassenschranken zur automatischen *Template*-Generation nicht bewährt. In diesem Zusammenhang wurde mit der Dichteuntersuchung von PCA-Punktwolken ein interessanter Ansatz zur Ermittlung von *Templates* getestet. Wie erwartet lässt sich die Korrelation bei gutem Signalrauschverhältnis zur Klassifizierung von Aktionspotentialen einsetzen. Bei kleinerem SNR nahm die Güte der Klassifikation (*Figure of Merit*) entsprechend ab. Dieser Effekt konnte bei allen untersuchten Korrelationsverfahren beobachtet werden. Es zeigte sich, dass bei einer Form-basierten Klassifizierung die Signallage berücksichtigt werden muss.

Diese Klassifikationsansätze wurden im Wesentlichen unter MATLAB[®] simuliert und ausgewertet. Teilweise erfolgte auch eine Implementierung auf zwei verschiedenen DSPs [328, 368]. Es bestätigte sich die Wichtigkeit von relevanten *Templates* für die Klassifizierung. Als problematisch ist die manuelle Suche und Bereitstellung von *Templates* zu bewerten. Trotz des prinzipiellen *Proof of Concept* muss die Anwendbarkeit der Korrelation zur Klassifikation auch in *Bursts*, also bei erhöhter Zellaktivität, nachgewiesen werden. Von einer Integration dieses Verfahrens in das Neuromesssystem des BISC 02 wurde abgesehen. Dennoch ließen sich die Korrelations-basierten Verfahren relativ einfach implementieren. Es werden in der Arbeitsgruppe derzeit alternative Verfahren zur *Template*-Gewinnung untersucht [353, 363]. Sollten die Ergebnisse der Simulation u. a. bezüglich der *Wavelet*-Filterung auf dem FPGA des NMA implementiert werden, so kann auch unter realistischen Bedingungen eine effektive Rauschunterdrückung der MEA-Signale sichergestellt und z. B. die Kreuzkorrelation zur Klassifizierung von Aktionspotentialen eingesetzt werden.

8.3 Anwendung des Chips

Nach der Verkapselung und der Präparation des Neurosensors BISC 02 konnten erfolgreiche MEA-Messungen an elektrisch aktiven Herzmuskelzellen durchgeführt werden. Der Messaufbau bestand dabei neben dem eigentlich Chip aus dem externen Neuromessadapter, einem FPGA-USB-Modul, einer Temperaturregelung, einer pH-Pufferung des Nährmediums mittels CO₂-Begasung, einer Ag/AgCl-Referenzelektrode und einer Spannungsversorgung. Die Signale der MEA-Elektroden wurden mittels RC-Hochpässen ausgekoppelt und anschließend auf dem Chip verstärkt, gefiltert und über Multiplexer und *Pad*-Treiber ausgegeben. Die resultierende Bandpassfilterung wurde hier in einem Bereich von etwa 500 Hz bis etwa 5 kHz wirksam. Die Signale wurden standardmäßig mit 33,3 kHz und einer Auflösung von 14 Bit digitalisiert.

Auf diese Weise stellte das Messsystem ca. 4,1 MByte/s an Daten zur Verfügung, welche im einfachsten Fall kontinuierlich auf einem Messrechner per USB 2.0 transferiert wurden. Die Daten konnten anschließend mit klassischen Werkzeugen der *offline* Analyse ausgewertet werden. Die abgeleiteten biphasischen Feldpotentiale der Herzmuskelkultur wiesen eine Amplitude von bis zu 1,2 mV und eine Wiederholrate von bis zu 2,8 Hz auf und stimmen gut mit vergleichbaren Messergebnissen überein [414–416]. Die Sensorchips wurden während der Messungen routinemäßig mehrfach verwendet. Mit diesen Messreihen konnte die Funktion des Sensorchips BISC 02 erfolgreich getestet und das Konzept der externen Sensorumgebung bestätigt werden.

9 Ausblick

Mit der erfolgreichen Messung an elektrisch aktiven Herzmuskelzellen konnte sowohl für den Silizium-basierten Sensorchip BISC 02 als auch für die externe Sensorumgebung der Funktionsnachweis erbracht werden. Unter Verwendung der passiven MEA-Elektroden des Sensorchips, der *on chip* Signalaufbereitung und einer externen Datenerfassung konnten extrazellulär gemessene Aktionspotentiale erfasst, konditioniert, digitalisiert und archiviert werden. Zur Ermöglichung einer multiparametrischen Messung an einem Zellverband innerhalb eines CMS[®] muss der externe Neuromessadapter erweitert werden. Entsprechende Komponenten zur Ansteuerung der auf dem Sensor zusätzlich vorhandenen ISFETs und CPFETs sind bereits im NMA vorgesehen. Diese Strukturen können modular in Betrieb genommen und in das Messsystem integriert werden. Neben der *Hardware*-Ergänzung gilt es auch die implementierte Signalvorverarbeitung zu überarbeiten.

Diese Verfahren sind mittels VHDL auf dem FPGA des Neuromessadapters realisiert. Neben einer flexibleren *Spike*-Extraktion und einer besseren Rauschabschätzung sollte dabei auch eine Rauschunterdrückung auf allen Skalen des mittels DWT zerlegten Messsignals erfolgen. Aufgrund dieser Filterung kann die Schwellen-basierte Detektion von Aktionspotentialen dann effektiver angewendet werden. Schließlich sollte die *Software* auf dem Messrechner so erweitert werden, dass neben der Datenarchivierung auch eine zeitnahe Beobachtung der Zellreaktionen möglich wird. Weiterhin könnte die Zellstimulation in das Sensorsystem integriert und das Verhalten des Chips in alternativen Betriebsmodi untersucht werden. Neben Auswirkung von Stimulusartefakten könnten so die verbleibenden Betriebsparameter für den Sensor ermittelt werden.

Zusätzlich scheint es sinnvoll zu sein, eine breitere Auswahl von bereits vorhandenen Ansätzen zur zeitnahen *Spike*-Klassifizierung unter definierten Bedingungen hinsichtlich ihrer Leistungsfähigkeit und ihres Implementierungsaufwandes zu bewerten. Aufbauend auf den erzielten Testergebnissen gilt es dann besonders geeignete Ansätze der *Unit*-Separation zu identifizieren. Da bereits seit mehreren Jahrzehnten weltweit Forschergruppen an entsprechenden Klassifikationsmethoden arbeiten, scheint es nicht unwahrscheinlich, dass anstatt völlig neuer Ansätze eine Kombination bereits bewährter Methoden zum Ziel führen könnte. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass auch mit dieser vorliegenden Arbeit gezeigt werden konnte, dass portable neuronale Sensorsysteme geschaffen werden können. Allerdings kann diese Sensortechnologie erst dann ihren Durchbruch erzielen, wenn die automatische Datenerfassung und hier vor allem die nicht überwachte Signalklassifizierung zuverlässig arbeiten.

Literaturverzeichnis

- [1] *Kapitel Clustering Methods and Algorithms*. In: JAIN, Anil K.; DUBES, Richard C.: *Algorithms for Clustering Data*. Prentice - Hall, 1988. – ISBN 013022278X, S. 55–142
- [2] *Kapitel Trends in Multichannel Neural Ensemble Recording Instrumentation*. In: SAMESHIMA, Koichi; BACCALA, Luiz A.: *Methods for Neural Ensemble Recordings*. CRC Press, 1998 (Methods for Neural Ensemble Recordings), S. 47–60
- [3] FORTUNA, L.; LA ROSA, M.; MARCHETTI, B.; NICOLOSI, D.; OCCHIPINTI, L.; SICURELLA, G.: Design of Active Microsystems to Support Neuron Growth and Diagnostics. In: *VDI, VDE, IT: Integrated Microsystems for Biomedicine 1* (2006), S. 10–11
- [4] OHM, Jens-Rainer; LÜKE, Hans D.: *Signalübertragung, Grundlagen der digitalen und analogen Nachrichtenübertragungssysteme*. 10. Auflage. Springer Verlag, 2007. – ISBN 978-3-540-69256-0
- [5] TAUTORAT, Carsten: *Entwurf und Realisierung einer Testumgebung für einen neuronalen Silizium-Hybrid-Netzwerksensor*, Universität Rostock, Diplomarbeit, 2005
- [6] BAUMANN, W. H.; LEHMANN, M.; SCHWINDE, A.; EHRET, R.; BRISCHWEIN, M.; WOLF, B.: Microelectronic sensor system for microphysiological application on living cells. In: *Sensors and Actuators B* 55 (1999), S. 77–89
- [7] KIRCHNER, Klaus-Peter: *Timing of Acquisition and USB-Transfer*. Universität Rostock, 2006
- [8] KIRCHNER, Klaus-Peter: *Timing of Acquisition, Filter and Sample Detection*. Universität Rostock, 2006
- [9] FREUND, Ingo: *Geschäftliche Kommunikation (E-Mail)*. Mai 2004. – Micronas GmbH, Freiburg (Breisgau)
- [10] KOESTER, Philipp; SAKOWSKI, Jan; BAUMANN, Werner; GLOCK, Hans-Walter; GIMSA, Jan: A new exposure system for the in vitro detection of GHz field effects on neuronal networks. In: *Bioelectrochemistry* 70 (2007), Nr. 1, S. 104–114
- [11] ZIEGLER, Christiane: Cell-based biosensors. In: *Fresenius Journal of Analytical Chemistry* 366 (2000), S. 552–559

- [12] STENGER, David A.; GROSS, Guenter W.; KEEFER, Edward W.; SHAFFER, Kara M.; ANDREADIS, Joanne D.; MA, Wu; PANCRAZIO, Joseph J.: Detection of physiologically active compounds using cell-based biosensors. In: *Trends in Biotechnology* 19 (2001), Nr. 8, S. 304–310
- [13] *Kapitel* Einführung: Signalanalyse im Nervensystem. In: NICHOLLS, John G.; MARTIN, A. R.; WALLACE, Bruce G.: *Vom Neuron zum Gehirn*. Stuttgart : Gustav Fischer Verlag, 1995, S. 3–17
- [14] *Kapitel* Membrankanäle und Signalentstehung. In: NICHOLLS, John. G.; MARTIN, A. R.; WALLACE, Bruce G.: *Vom Neuron zum Gehirn*. Gustav Fischer Verlag, 1995, S. 20–45
- [15] *Kapitel* Electrodes for Many Single Neurons Recordings. In: SCHMIDT, Edward M.: *Methods for Neural Ensemble Recordings*. Nicolelis, Miguel A.L., 1998, S. 1–23
- [16] KRAUSE, Guido: *Monitoring of electrophysiological and metabolic activity of neural networks with CMOS chip technology*, Universität Rostock, Diss., 2005
- [17] GRAMOWSKI, Alexandra; JÜGELT, Konstantin; WEISS, Dieter G.; GROSS, Guenter W.: Substance identification by quantitative characterisation of oscillatory activity in murine spinal cord networks on microelectrode arrays. In: *European Journal of Neuroscience* 19 (2004), S. 2815–2825
- [18] BAUMANN, Werner; SCHREIBER, Erik; KRAUSE, Guido; STÜWE, Simone; PODSSUN, Angela; HOMMA, Susanne; ANLAUF, Holger; ROSNER, Ronny; FREUND, Ingo; LEHMANN, Mirko: Multiparametric neurosensor microchip. In: *Euroensors XVI*. Prague, 2002, S. 1169–1172
- [19] BAUMANN, Werner; SCHREIBER, Erik; KRAUSE, Guido; PODSSUN, Angela; HOMMA, Susanne; SCHROTT, René; BEIKIRCH, Helmut; EHRET, Ralf; KEUER, Andreas; FREUND, Ingo; MIRKO, Lehmann: Zell Monitoring System mit multiparametrischen CMOS Biosensorchips. In: *7. Dresdner Sensor-Symposium - Neue Herausforderungen und Anwendungen in der Sensortechnik* Bd. 24, TUDpress, 2005. – ISBN 3938863293, S. 95–98
- [20] THOMAS JR., C. A.; SPRINGER, P. A.; LOEB, G. E.; BERWALD-NETTER, Y.; OKUN, L. M.: A miniature microelectrode array to monitor the bioelectric activity of cultured cells. In: *Experimental Cell Research* 74 (1972), S. 61–66
- [21] GROSS, G. W.: Simultaneous single unit recording in vitro with a photoetched laser deinsulated gold multimicroelectrode surface. In: *IEEE Transactions on Biomedical Engineering* 26 (1979), Nr. 5, S. 273–279. – 0018-9294 Journal Article
- [22] PINE, Jerome: Recording action potentials from cultured neurons with extracellular microcirciut electrodes. In: *Journal of Neuroscience Methods* 2 (1980), S. 19–30
- [23] GROSS, Guenter W.; RHOADES, Barry K.; AZZAZY, Hassan M. E.; MING-CHI, Wu: The use of neuronal networks on multielectrode arrays as biosensors. In: *Biosensors and Bioelectronics* 10 (1995), Nr. 6-7, S. 553–567

- [24] KEEFER, Edward W.; GRAMOWSKI, Alexandra; STENGER, David A.; PANCRIZIO, Joseph J.; GROSS, Günter W.: Characterization of acute neurotoxic effects of trimethylolpropane phosphate via neuronal network biosensors. In: *Biosensors and Bioelectronics* 16 (2001), Nr. 7-8, S. 513–525
- [25] EHRET, Ralf; BAUMANN, Werner; WEISS, Dieter G.; GRAAGE, Frank: NeuroSensorix: Nervenzellen auf Sensorchips. In: *Laborwelt* 5 (2004), Nr. 6, S. 8–13
- [26] BAUMANN, Werner H.: *Entwicklung eines Meßsystems zur zellulären Signalanalyse auf der Basis von Feldeffektransistoren*, Albert-Ludwigs-Universität Freiburg, Fakultät für Biologie, Diss., 1996
- [27] EHRET, R.; BAUMANN, W.; BRISCHWEIN, M.; SCHWINDE, A.; STEGBAUER, K.; WOLF, B.: Monitoring of cellular behaviour by impedance measurements on interdigitated electrode structures. In: *Biosensors and Bioelectronics* 12 (1997), Nr. 1, S. 29–41
- [28] WOLF, Bernhard; BRISCHWEIN, Martin; BAUMANN, Werner; EHRET, Ralf; KRAUS, Michael: Monitoring of cellular signalling and metabolism with modular sensor-technique: The PhysioControl-Microsystem. In: *Biosensors and Bioelectronics* 13 (1998), Nr. 5, S. 501–509
- [29] SCHROTT, René; TAUTORAT, Carsten; KIRCHNER, Klaus-Peter; BAUSCH, Gerold; BEIKIRCH, Helmut; BAUMANN, Werner; FREUND, Ingo: Sensor System with Integrated Electronics and Embedded Signal Processing for Neural Activity Monitoring. In: *Embedded World Conference*, WEKA Fachzeitschriftenverlag, 2007. – CD
- [30] EHRET, R.; BAUMANN, W.; BRISCHWEIN, M.; SCHWINDE, A.; WOLF, B.: On-line control of cellular adhesion with impedance measurements using interdigitated electrode structures. In: *Med Biol Eng Comput* 36 (1998), Nr. 3, S. 365–70
- [31] GROSS, Guenter W.; HARSCH, Annette; RHOADES, Barry K.; GOPPEL, Wolfgang: Odor, drug and toxin analysis with neuronal networks in vitro: extracellular array recording of network responses. In: *Biosensors and Bioelectronics* 12 (1997), Nr. 5, S. 373–393
- [32] KRAUSE, Guido; LEHMANN, Stefanie; LEHMANN, Mirko; FREUND, Ingo; SCHREIBER, Erik; BAUMANN, Werner: Measurement of electrical activity of long-term mammalian neuronal networks on semiconductor neurosensor chips and comparison with conventional microelectrode arrays. In: *Biosensors and Bioelectronics* 21 (2006), Nr. 7, S. 1272–1282
- [33] SCHREIBER, Erik; BAUMANN, Werner; KRAUSE, Guido; PODSSUN, Angela; HOMMA, Susanne; SCHROTT, René; EHRET, Ralf; FREUND, Ingo; LEHMANN, Mirko: PSPICE Modelling of Cell-Electrode Coupling. In: *International MEA Meeting NMI Reutlingen, BIOPRO Baden-Württemberg*, 2004, 74
- [34] WOOD, F.; BLACK, M.J.; VARGAS-IRWIN, C.; FELLOWS, M.; DONOGHUE, J.P.: On the variability of manual spike sorting. In: *IEEE Transactions on Biomedical Engineering* 51 (2004), Nr. 6, S. 912–918

- [35] PANCAZIO, J. J.; WHELAN, J. P.; BORKHOLDER, D. A.; MA, W.; STENGER, D. A.: Development and Application of Cell-Based Biosensors. In: *Annals of Biomedical Engineering* 27 (1999), S. 697–711
- [36] *Kapitel* Lab-on-a-Chip Systems for Cellular Assays. In: WOLF, Bernhard; BRISCHWEIN, Martin; GROTHE, Helmut; STEPPER, Christoph; RESSLER, Johann; WEYH, Thomas: *BioMEMS*. Springer Verlag, 2006, S. 269–308
- [37] OTTO, Angela M.; BRISCHWEIN, Martin; NIENDORF, Axel; HENNING, Tobias; MOTRESCU, Elena; WOLF, Bernhard: Microphysiological testing for chemosensitivity of living tumor cells with multiparametric microsensor chips. In: *Cancer Detection and Prevention* 27 (2003), Nr. 4, S. 291–296
- [38] EHRET, R; BAUMANN, W.; BRISCHWEIN, M.; LEHMANN, M.; HENNING, T.; FREUND, I.; DRECHSLER, S.; FRIEDRICH, U.; HUBERT, M.-L.; MOTRESCU, E.; KOB, A.; PALZER, H.; GROTHE, H.; WOLF, B.: Multiparametric microsensor chips for screening applications. In: *Fresenius Journal of Analytical Chemistry* 369 (2001), S. 30–35
- [39] WIEST, J.; BRISCHWEIN, M.; RESSLER, J.; A.M., Otto; H., Grothe; B., Wolf: Cellular Assays with Multiparametric Bioelectronic Sensor Chips. In: *Chemical Sensors and Bioassays* 59 (2005), S. 243–246
- [40] BRISCHWEIN, Martin; HERRMANN, Sigrun; VONAU, Winfried; BERTHOLD, Frank; GROTHE, Helmut; MOTRESCU, Elena R.; WOLF, Bernhard: Electric cell-substrate impedance sensing with screen printed electrode structures. In: *Lab Chip* 6 (2006), S. 819–822
- [41] ILCHMANN, Florian; RESSLER, Johann; MEYER, Jochen; GROTHE, Helmut; WOLF, Bernhard: Recording chamber for glass sensor chips with MEA and integrated oxygen-, pH- and temperature sensors. In: *International MEA Meeting* NMI Reutlingen, BIO-PRO Baden-Württemberg, 2006. – ISBN 3938345020, 222–223
- [42] MARTINOIA, Sergio; ROSSO, Nicola; GRATTAROLA, Massimo; LORENZELLI, Leandro; MARGESIN, Benno; ZEN, Mario: Development of ISFET array-based microsystems for bioelectrochemical measurements of cell populations. In: *Biosensors and Bioelectronics* 16 (2001), Nr. 9-12, S. 1043–1050
- [43] LORENZELLI, Leandro; MARGESIN, Benno; MARTINOIA, Sergio; TEDESCO, M.T.; VALLE, Maurizio: Bioelectrochemical signal monitoring of in-vitro cultured cells by means of an automated microsystem based on solid state sensor-array. In: *Biosensors and Bioelectronics* 18 (2003), S. 621–626
- [44] MARTINOIA, Sergio; LORENZELLI, Leandro; MASSOBRIO, Giuseppe; CONCI, Paolo; LUI, Alberto: Temperature effects on the ISFET behaviour: simulations and measurements. In: *Sensors and Actuators B* 50 (1998), S. 60–68
- [45] MARTINOIA, Sergio; MASSOBRIO, Paolo: ISFET–neuron junction: circuit models and extracellular signal simulations. In: *Biosensors and Bioelectronics* 19 (2004), S. 1487–1496

- [46] MARTINOIA, Sergio; MASSOBRIO, Giuseppe; LORENZELLI, Leandro: Modeling ISFET microsensor and ISFET-based microsystems: a review. In: *Sensors and Actuators B: Chemical* 105 (2005), Nr. 1, S. 14–27
- [47] *Kapitel* Application of the microelectrode-array (MEA) technology in pharmaceutical drug research. In: EGERT, U.; HÄMMERLE, H.: *Sensoren im Fokus neuer Anwendungen*. w.e.b. Universitätsverlag, Dresden, 2002, S. 51–54
- [48] BORKHOLDER, David A.: *Cell Based Biosensors using Microelectrodes*, Stanford University, Department of Electrical Engineering, Diss., 1998
- [49] *Kapitel* Distributed processing in cultured neuronal networks. In: POTTER, Steve M.: *Advances in Neural Population Coding*. Bd. 130. Elsevier Science, 2001, S. 49–62
- [50] MORIN, Fabrice O.; TAKAMURA, Yuzuru; TAMIYA, Eiichi: Investigating Neuronal Activity with Planar Microelectrode Arrays: Achievements and New Perspectives. In: *Journal of Bioscience and Bioengineering* 100 (2005), Nr. 2, S. 131–143
- [51] GROSS, Guenter W.; WILLIAMS, Ann N.; LUCAS, Jen H.: Recording of spontaneous activity with photoetched microelectrode surfaces from mouse spinal neurons in culture. In: *Journal of Neuroscience Methods* 5 (1982), S. 13–22
- [52] GROSS, Guenter W.; WEN, Walter Y.; LIN, Jacob W.: Transparent indium-tin oxide electrode patterns for extracellular, multisite recording in neural cultures. In: *Journal of Neuroscience Methods* 15 (1985), S. 243–252
- [53] GROSS, Guenter W.; RHOADES, Barry K.; REUST, Daryl L.; SCHWALM, Fritz U.: Stimulation of monolayer networks in culture through thin-film indium-tin oxide recording electrodes. In: *Journal of Neuroscience Methods* 50 (1993), S. 131–143
- [54] MEISTER, Markus; PINE, Jerome; BAYLOR, Denis A.: Multi-neuronal signals from the retina: acquisition and analysis. In: *Journal of Neuroscience Methods* 51 (1994), Nr. 1, S. 95–106
- [55] REGEHR, Wade G.; PINE, Jerome; RUTLEDGE, David B.: A Long-Term In Vitro Silicon-Based Microelectrode-Neuron Connection. In: *IEEE Transactions on Biomedical Engineering* 35 (1988), Nr. 12, S. 1023–1032
- [56] HE, Qing; MENG, Ellis; TAI, Yu-Chong; RUTHERGLEN, Christopher M.; ERICKSON, Jon; PINE, Jerome: Parylene Neuro-Cages for Live Neural Networks Study. In: *The 12th International Conference on Solid-State Sensors, Actuators and Microsystems, Transducers'03*, 2003
- [57] TOOKER, Angela; MENG, Ellis; ERICKSON, Jon; TAI, Yu-Chong; PINE, Jerry: Biocompatible parylene neurocages developing a robust method for live neural network studies. In: *IEEE Engineering in Medicine and Biology Magazine* 24 (2005), Nr. 6, S. 30–33

- [58] WAGENAAR, Daniel A.; PINE, Jerome; POTTER, Steve M.: Effective parameters for stimulation of dissociated cultures using multi-electrode arrays. In: *Journal of Neuroscience Methods* 138 (2004), Nr. 1-2, S. 27–37
- [59] WAGENAAR, Daniel A.; PINE, Jerome; POTTER, Steve M.: An extremely rich repertoire of bursting patterns during the development of cortical cultures. In: *BMC Neuroscience* 7 (2006), 11.1–11.35. <http://www.biomedcentral.com/1471-2202/7/11>
- [60] MAHER, Michael P.; PINE, Jerome; WRIGHT, John; TAI, Yu-Chong: The neurochip: a new multielectrode device for stimulating and recording from cultured neurons. In: *Journal of Neuroscience Methods* 87 (1999), S. 45–56
- [61] EGERT, U.; SCHLOSSHAUER, B.; FENNRICH, S.; NISCH, W.; FEJTL, M.; KNOTT, T.; MÜLLER, T.; HÄMMERLE, H.: A novel organotypic long-term culture of the rat hippocampus on substrate-integrated multielectrode arrays. In: *Brain Research Protocols* 2 (1998), S. 229–242
- [62] STETT, Alfred; EGERT, Ulrich; GUENTHER, Elke; HOFMANN, Frank; MEYER, Thomas; NISCH, Wilfried; HÄMMERLE, Hugo: Biological application of microelectrode arrays in drug discovery and basic research. In: *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 377 (2003), S. 486–495
- [63] STETT, Alfred; RUDORF, Ralf; STEIN, Bernhard; EGERT, Ulrich; BOVEN, Karl-Heinz; GOTTSCHLICH, Norbert; NISCH, Wilfried: Perforated polyimide microelectrode arrays for single-cell and tissue recording. In: *Mikrosystemtechnik Kongress 2005*. Freiburg, Deutschland : VDE Verlag, 2005. – ISBN 3800729261, S. 427–430
- [64] STIPHOUT, Peter van; KNOTT, Thomas; DANKER, Timm; STETT, Alfred: 3D Microfluidic Chip for Automated Patch-Clamping. In: *Mikrosystemtechnik Kongress 2005*. Freiburg, Deutschland : VDE Verlag, 2005. – ISBN 3800729261, S. 435–438
- [65] THIÉBAUD, Pierre; BEURET, Cynthia; KOUDELKA-HEP, Milena; BOVE, Marco; MARTINOIA, Sergio; GRATTAROLA, Massimo; JAHNSEN, Henrik; REBAUDO, Renata; BALESTRINO, Maurizio; ZIMMER, Jens; DUPONT, Yves: An array of Pt-tip microelectrodes for extracellular monitoring of activity of brain slices. In: *Biosensors and Bioelectronics* 14 (1999), S. 61–65
- [66] JAHNSEN, Henrik; KRISTENSEN, Pierre Bjarne W. and T. Bjarne W. and Thiébaud; NORBERG, Jens; JAKOBSEN, Birthe; BOVE, Marco; MARTINOIA, Sergio; KOUDELKA-HEP, Milena; GRATTAROLA, Massimo; ZIMMER, Jens: Coupling of Organotypic Brain Slice Cultures to Silicon-Based Arrays of Electrodes. In: *METHODS: A Companion to Methods in Enzymology* 18 (1999), S. 160–172
- [67] MARTINOIA, S.; BONZANO, L.; CHIAPPALONE, M.; TEDESCO, M.; MARCOLI, M.; MAURA, G.: In vitro cortical neuronal networks as a new high-sensitive system for biosensing applications. In: *Biosensors and Bioelectronics* 20 (2005), Nr. 10, S. 2071–2078

- [68] BERDONINI, L.; CHIAPPALONE, M.; WAL, P.D. van d.; IMFELD, K.; ROOIJ, N.F. de; KOUDELKA-HEP, M.; TEDESCO, M.; MARTINOIA, S.; PELT, J. van; LE MASSONC, G.; GARENNE, A.: A microelectrode array (MEA) integrated with clustering structures for investigating in vitro neurodynamics in confined interconnected sub-populations of neurons. In: *Sensors and Actuators B: Chemical* 114 (2006), S. 530–541
- [69] BERDONINI, L.; WAL, P. D. d.; GUENAT, O.; ROOIJ, N. F.; KOUDELKA-HEP, M.; SEITZ, P.; KAUFMANN, R.; METZLER, P.; BLANC, N.; ROHR, S.: High-density electrode array for imaging in vitro electrophysiological activity. In: *Biosensors and Bioelectronics* 21 (2005), Nr. 1, S. 167–174
- [70] BORKHOLDER, D.A.; BAO, J.; MALUF, N.I.; PERL, E.R.; KOVACS, G.T.A.: Microelectrode arrays for stimulation of neural slice preparations. In: *Journal of Neuroscience Methods* 77 (1997), S. 61–66
- [71] PANCRAZIO, Joseph J.; BEY JR., Paul P.; LOLOEE, Arash; MANNE, SubbaRao; CHAO, Hui-Chuan; HOWARD, Lorn L.; GOSNEY, W. M.; BORKHOLDER, David A.; KOVACS, Gregory T.; MANOS, Patricia; CUTTINO, David S.; STENGER, David A.: Description and demonstration of a CMOS amplifier-based-system with measurement and stimulation capability for bioelectrical signal transduction. In: *Biosensors and Bioelectronics* 13 (1998), S. 971–979
- [72] PANCRAZIO, Joseph J.; BEY JR, Paul P.; CUTTINO, David S.; KUSEL, Julian K.; BORKHOLDER, David A.; SHAFFER, Kara M.; KOVACS, Gregory T.; STENGER, David A.: Portable cell-based biosensor system for toxin detection. In: *Sensors and Actuators B* 53 (1998), S. 179–185
- [73] GRAY, Samuel A.; KUSEL, Julian K.; SHAFFER, Kara M.; SHUBIN, Yura S.; STENGER, David A.; PANCRAZIO, Joseph J.: Design and demonstration of an automated cell-based biosensor. In: *Biosensors and Bioelectronics* 16 (2001), S. 535–542
- [74] DEBUSSCHERE, B. D.; KOVACS, Gregory T.: Portable cell-based biosensor system using integrated CMOS cell-cartridges. In: *Biosensors and Bioelectronics* 16 (2001), S. 543–556
- [75] PANCRAZIO, Joseph J.; GRAY, Samuel A.; SHUBIN, Yura S.; KULAGINA, Nadezhda; CUTTINO, David S.; SHAFFER, Kara M.; EISEMANN, Kevin; CURRAN, Anthony; ZIM, Bret; GROSS, Guenter W.; O'SHAUGHNESSY, Thomas J.: A portable microelectrode array recording system incorporating cultured neuronal networks for neurotoxin detection. In: *Biosensors and Bioelectronics* 18 (2003), Nr. 11, S. 1339–1347
- [76] LITKE, A.M.: The Retinal Readout System: a status report. In: *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research A* 435 (1999), S. 242–249
- [77] LITKE, A. M.; BEZAYIFF, N.; CHICHILNISKY, E. J.; CUNNINGHAM, W.; DABROWSKI, W.; GRILLO, A. A.; GRIVICH, M.; GRYBOS, P.; HOTTOWY, P.; KACHIGUINE, S.; KALMAR, R. S.; MATHIESON, K.; PETRUSCA, D.; RAHMAN, M.; SHER, A.: What Does the Eye Tell the Brain?:

- Development of a System for the Large-Scale Recording of Retinal Output Activity. In: *IEEE Transactions on Nuclear Science* 51 (2004), Nr. 4, S. 1434–1440
- [78] CUNNINGHAM, W.; MATHIESON, K.; MCEWAN, F. A.; BLUE, A.; MCGEACHY, R.; MCLEOD, J. A.; MORRIS-ELLIS, C.; O'SHEA, V.; SMITH, K. M.; LITKE, A.; RAHMAN, M.: Fabrication of microelectrode arrays for neural measurements from retinal tissue. In: *Journal of Physics D: Applied Physics* 34 (2001), S. 2804–2809
- [79] MATHIESON, K.; CUNNINGHAM, W.; MARCHAL, J.; MELONE, J.; HORN, M.; GUNNING, D.; TANG, R.; WILKINSON, C.; O'SHEA, V.; SMITH, K.M.; LITKE, A.; CHICHILNISKY, E.J.; RAHMAN, M.: Detection of retinal signals using position sensitive microelectrode arrays. In: *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research A* 513 (2003), S. 51–56
- [80] GUNNING, D.; ADAMS, C.; CUNNINGHAM, W.; MATHIESON, K.; O'SHEA, V.; SMITH, K.M.; CHICHILNISKY, E.J.; LITKE, A.M.; RAHMAN, M.: 30 μm spacing 519-electrode arrays for in vitro retinal studies. In: *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research A* 546 (2005), S. 148–153
- [81] DABROWSKI, W.; GRYBOS, P.; LITKE, A.M.: A low noise multichannel integrated circuit for recording neuronal signals using microelectrode arrays. In: *Biosensors and Bioelectronics* 19 (2004), S. 749–761
- [82] DABROWSKI, W.; GRYBOS, P.; HOTTOWY, P.; SKOCZEN, A.; SWIENTEK, K.; GRILLO, A.A.; KACHIGUINE, S.; LITKE, A.M.; SHER, A.: Development of front-end ASICs for imaging neuronal activity in live tissue. In: *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research A* 541 (2005), S. 405–411
- [83] FRANKS, W.; HEER, F.; MCKAY, I.; TASCHINI, S.; SUNIER, R.; HAGLEITNER, C.; HIERLEMANN, A.; BALTES, H.: CMOS Monolithic Microelectrode Array for Stimulation and Recording of Natural Neural Networks. In: *12th International Conference on Solid State Sensors, Actuators and Microsystems* Bd. 2. Boston, USA, 2003, S. 963–966
- [84] HEER, F.; FRANKS, W.; BLAU, A.; TASCHINI, S.; ZIEGLER, C.; HIERLEMANN, A.; BALTES, H.: CMOS microelectrode array for the monitoring of electrogenic cells. In: *Biosensors and Bioelectronics* 20 (2004), S. 358–366
- [85] HEER, Flavio; HAFIZOVIC, Sadik; FRANKS, Wendy; FREY, Urs; GREVE, Frauke; BLAU, Axel; UGNIWENKO, Tanja; ZIEGLER, Christiane; HIERLEMANN, Andreas: CMOS Integrated Bi-directional 128-Electrode Array for Electrogenic Cells. In: *International MEA Meeting NMI Reutlingen, BIOPRO Baden-Württemberg, 2006.* – ISBN 3938345020, 212–213
- [86] KOESTER, J. P.; TAUTORAT, C.; BÜHLER, S.; SAKOWSKI, J.; SCHROTT, R.; BAUMANN, W.; GIMSA, J.: A New Glass Chip System Acquiring Electric Activity and Physiological Parameters of Differentiated Stem Cells. In: *International MEA Meeting NMI Reutlingen, BIOPRO Baden-Württemberg, 2008.* – ISBN 3-938345-05-5, S. 315–316

- [87] BAUMANN, Werner; SCHREIBER, Erik; KRAUSE, Guido; PODSSUN, Angela; HOMMA, Susanne; SCHROTT, René; EHRET, Ralf; FREUND, Ingo; LEHMANN, Mirko: Multiparametric Microchips. In: *International MEA Meeting NMI Reutlingen, BIOPRO Baden-Württemberg*, 2004, 21
- [88] BAUMANN, Werner; SCHREIBER, Erik; KRAUSE, Guido; PODSSUN, Angela; HOMMA, Susanne; SCHROTT, René; EHRET, Ralf; FREUND, Ingo; LEHMANN, Mirko: Cell Monitoring System with Multiparametric CMOS Sensorchips. In: *International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences, μ -TAS*. Malmö, Sweden, 2004, S. 554–556
- [89] BAUMANN, Werner; SCHREIBER, Erik; KRAUSE, Guido; PODSSUN, Angela; HOMMA, Susanne; SCHROTT, René; BEIKIRCH, Helmut; EHRET, Ralf; KEUER, Andreas; FREUND, Ingo; LEHMANN, Mirko: Zell Monitoring System mit multiparametrischen CMOS Halbleiter Mikrosensorchips. In: *Mikrosystemtechnik Kongress 2005*. Freiburg : VDE Verlag, 2005. – ISBN 3800729261, S. 345–348
- [90] NOVAK, James L.; WHEELER, Bruce C.: Multisite hippocampal slice recording and stimulation using a 32 element microelectrode array. In: *Journal of Neuroscience Methods* 23 (1988), S. 149–159
- [91] JIMBO, Yasuhiko; KAWANA, Akio: Electrical stimulation and recording from cultured neurons using a planar electrode array. In: *Bioelectrochemistry and Bioenergetics* 29 (1992), S. 193–204
- [92] CHANG, John C.; BREWER, Gregory J.; WHEELER, Bruce C.: Modulation of neural network activity by patterning. In: *Biosensors and Bioelectronics* 16 (2001), S. 527–533
- [93] THIÉBAUD, Pierre; LAUER, Lars; KNOLL, Wolfgang; OFFENHÄUSSER, Andreas: PDMS device for patterned application of microfluids to neuronal cells arranged by microcontact printing. In: *Biosensors and Bioelectronics* 17 (2002), S. 87–93
- [94] GREVE, Frauke: *Micromachined Platforms For Manipulating And Recording From Cells*, Swiss Federal Institute of Technology Zürich, Physical Electronics Laboratory, Diss., 2006
- [95] BUCHER, Volker; BRUNNER, Bernhard; LEIBROCK, Cornelia; SCHUBERT, Markus; NISCH, Wilfried: Electrical properties of a light-addressable microelectrode chip with high electrode density for extracellular stimulation and recording of excitable cells. In: *Biosensors and Bioelectronics* 16 (2001), S. 205–210
- [96] SANDISON, M.; CURTIS, A.S.G.; WILKINSON, C.D.W.: Effective extra-cellular recording from vertebrate neurons in culture using a new type of micro-electrode array. In: *Journal of Neuroscience Methods* 114 (2002), S. 63–71
- [97] SUZUKI, Ikuro; SUGIO, Yoshihiro; MORIGUCHI, Hiroyuki; JIMBO, Yasuhiko; YASUDA, Kenji: Modification of a neuronal network direction using stepwise photo-thermal etching of an agarose architecture. In: *Journal of Nanobiotechnology* 2 (2004), S. 1–7

- [98] HEUSCHKEL, M.O.; GUÉRIN, L.; BUISSON, B.; BERTRAND, D.; RENAUD, P.: Buried microchannels in photopolymer for delivering of solutions to neurons in a network. In: *Sensors and Actuators B* 48 (1998), S. 356–361
- [99] HEUSCHKEL, Marc O.; FEJTL, Michael; RAGGENBASS, Mario; BERTRAND, Daniel; RENAUD, Philippe: A three-dimensional multi-electrode array for multi-site stimulation and recording in acute brain slices. In: *Journal of Neuroscience Methods* 114 (2002), S. 135–148
- [100] CHANG, John C.; BREWER, Gregory J.; WHEELER, Bruce C.: Neuronal network structuring induces greater neuronal activity through enhanced astroglial development. In: *Journal of Neural Engineering* 3 (2006), S. 217–226
- [101] CONNOLLY, P.; CLARK, P.; CURTIS, A. S. G.; DOW, J. A. T.; WILKINSON, C. D. W.: An Extracellular Microelectrode Array for Monitoring Electrogenic Cells in Culture. In: *Biosensors and Bioelectronics* 5 (1990), S. 223–234
- [102] BRECKENRIDGE, L. J.; WILSON, R. J. A.; CONNOLLY, P.; CURTIS, A. S. G.; DOW, J. A. T.; BLACKSHAW, S. E.; WILKINSON, C. D. W.: Advantages of Using Microfabricated Extracellular Electrodes for In Vitro Neuronal Recording. In: *Journal of Neuroscience Research* 42 (1995), S. 266–276
- [103] CURTIS, Adam; WILKINSON, Chris: Topographical control of cells. In: *Biomaterials* 18 (1997), Nr. 24, S. 1573–1583
- [104] CURTIS, Adam S. G.; WILKINSON, Chris D. W.: Reactions of cells to topography. In: *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition* 9 (1998), Nr. 12, S. 1313–1329
- [105] CURTIS, A.S.G.: Cell Reactions with Biomaterials: The Microscopies. In: *European Cells and Materials* 1 (2001), S. 59–65
- [106] FROMHERZ, Peter; OFFENHÄUSSER, Andreas; VETTER, Thomas; WEIS, Jürgen: A Neuron-Silicon Junction: A Retzius Cell of the Leech on an Insulated-Gate Field-Effect Transistor. In: *Science* 252 (1991), Nr. 5010, S. 1290–1293
- [107] FROMHERZ, Peter; STETT, Alfred: Silicon-Neuron-Junction: Capacitive Stimulation of an Individual Neuron on a Silicon Chip. In: *Physical Review Letters* 75 (1995), Nr. 8, S. 1670–1674
- [108] STETT, Alfred; MÜLLER, Bernt; FROMHERZ, Peter: Two-way silicon-neuron interface by electrical induction. In: *Physical Review E* 55 (1997), Nr. 2, S. 1779–1782
- [109] VASSANELLI, S.; FROMHERZ, P.: Transistor records of excitable neurons from rat brain. In: *Applied Physics A* 66 (1998), S. 459 – 463
- [110] JENKNER, Martin; MÜLLER, Bernt; FROMHERZ, Peter: Interfacing a silicon chip to pairs of snail neurons connected by electrical synapses. In: *Biological Cybernetics* 84 (2001), S. 239–249

- [111] FROMHERZ, Peter: Semiconductor chips with ion channels, nerve cells and brain. In: *Physica E* 16 (2003), S. 24–34
- [112] EVERSMAAN, Björn; JENKNER, Martin; HOFMANN, Franz; PAULUS, Christian; BREDERLOW, Ralf; HOLZAPFL, Birgit; FROMHERZ, Peter; MERZ, Matthias; BRENNER, Markus; SCHREITER, Matthias; GABL, Reinhard; PLEHNERT, Kurt; STEINHAUSER, Michael; ECKSTEIN, Gerald; SCHMITT-LANDSIEDEL, Doris; THEWES, Roland: A 128 x 128 CMOS Biosensor Array for Extracellular Recording of Neural Activity. In: *IEEE Journal of Solid State Circuits* 38 (2003), Nr. 12, S. 2306–2317
- [113] LAMBACHER, A.; JENKNER, M.; MERZ, M.; EVERSMAAN, B.; KAUL, R.A.; HOFMANN, F.; THEWES, R.; FROMHERZ, P.: Electrical imaging of neuronal activity by multi-transistor-array recording at 7,8 μm resolution. In: *Applied Physics A* 79 (2004), S. 1607–1611
- [114] HUTZLER, Michael; FROMHERZ, Peter: Silicon chip with capacitors and transistors for interfacing organotypic brain slice of rat hippocampus. In: *Journal of Neuroscience* 19 (2004), S. 2231–2238
- [115] OFFENHÄUSSER, Andreas; SPRÖSSLER, Christoph; MATSUZAWA, Mieko; KNOLL, Wolfgang: Field-Effect transistor array for monitoring electrical activity from mammalian neurons in culture. In: *Biosensors and Bioelectronics* 12 (1997), Nr. 8, S. 819–826
- [116] SPRÖSSLER, Christoph; RICHTER, Dirk; DENYER, Morgan; OFFENHÄUSSER, Andreas: Long-term recording system based on field-effect transistor arrays for monitoring electrogenic cells in culture. In: *Biosensors and Bioelectronics* 13 (1998), S. 613–618
- [117] KRAUSE, M.; INGEBRANDT, S.; RICHTER, D.; DENYER, M.; SCHOLL, M.; SPRÖSSLER, C.; OFFENHÄUSSER, A.: Extended gate electrode arrays for extracellular signal recordings. In: *Sensors and Actuators B* 70 (2000), S. 101–107
- [118] ECKEN, H.; INGEBRANDT, S.; KRAUSE, M.; RICHTER, D.; HARA, M.; OFFENHÄUSSER, A.: 64-Channel extended gate electrode arrays for extracellular signal recording. In: *Electrochimica Acta* 48 (2003), S. 3355–3362
- [119] YEUNG, C.-K.; INGEBRANDT, S.; KRAUSE, M.; OFFENHÄUSSER, A.; KNOLL, W.: Validation of the use of field effect transistors for extracellular signal recording in pharmacological bioassays. In: *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods* 45 (2001), S. 207–214
- [120] WROBEL, Günter; SEIFERT, Reinhard; INGEBRANDT, Sven; ENDERLEIN, Jörg; ECKEN, Holger; BAUMANN, Arnd; KAUPP, U. B.; OFFENHÄUSSER, Andreas: Cell-Transistor Coupling: Investigation of Potassium Currents Recorded with p- and n-Channel FETs. In: *Biophysical Journal* 89 (2005), S. 3628–3638
- [121] INGEBRANDT, Sven; YEUNG, Chi-Kong; KRAUSE, Michael; OFFENHÄUSSER, Andreas: Neuron–transistor coupling: interpretation of individual extracellular recorded signals. In: *European Biophysics Journal with Biophysics Letters* 34 (2005), S. 144–154

- [122] MEYBURG, Sven; GORYLL, Michael; MOERS, Jürgen; INGEBRANDT, Sven; BÖCKER-MEFFERT, Simone; LÜTH, Hans; OFFENHÄUSSER, Andreas: N-Channel field-effect transistors with floating gates for extracellular recordings. In: *Biosensors and Bioelectronics* 21 (2006), S. 1037–1044
- [123] WOLF, Bernhard: *Technische Universität München, Heinz-Nixdorf-Lehrstuhl für Medizinische Elektronik - Ausgründungen*. Version: Juni 2007. <http://www.lme.ei.tum.de/ausgruendung.htm>, Abruf: 02.10.2007. Internet
- [124] BIONAS GMBH: *Bionas[®] in vitro systems - Products*. <http://bionas.de/products.php>, Abruf: 02.10.2007. Internet
- [125] BIONAS GMBH: *Bionas[®] 2500 Analyzing System Application Note 001*. Version: 2006. <http://bionas.de/Downloads/Bionas2500-Application.pdf>, Abruf: 12.04.2006. Internet
- [126] BIONAS GMBH: *Bionas[®] Präsentationsmappe*. Version: 2004. <http://bionas.de/Downloads/bionas.pdf>, Abruf: 05.04.2006. Internet
- [127] THEDINGA, E.; KOB, A.; HOLST, H.; KEUER, A.; DRECHSLER, S.; NIENDORF, R.; BAUMANN, W.; FREUND, I.; LEHMANN, M.; EHRET, R.: *New Automated Cell based Analyzing System for Reduction of Animal Tests*. Version: 2006. http://bionas.de/Downloads/reduction_of_animal_tests.pdf, Abruf: 12.04.2006. Internet
- [128] HAFNER, Frank: Cytosensor[®] Microphysiometer: technology and recent applications. In: *Biosensors and Bioelectronics* 15 (2000), S. 149–158
- [129] LANDIN, W. E.; MUN, G. C.; NIMS, R. W.; HARBELL, J. W.: Use of the cytosensor microphysiometer to predict results of a 21-day cumulative irritation patch test in humans. In: *Toxicology in Vitro* 21 (2007), Nr. 6, S. 1165–1173
- [130] MULTI CHANNEL SYSTEMS MCS GMBH: *Microelectrode Arrays for all Applications*. Version: 2004. http://www.multichannelsystems.com/products/meaprobes/meatypes/MEAApp1_Brochure.pdf, Abruf: 05.04.2006. Internet
- [131] MULTI CHANNEL SYSTEMS MCS GMBH: *Microelectrode Arrays - MEA Types*. <http://www.multichannelsystems.com/products/meaprobes/meatypes/meatypesintro.htm>, Abruf: 04.04.2006. Internet
- [132] MULTI CHANNEL SYSTEMS MCS GMBH: *MEA System User Manual*. http://www.mcs-download.com/download_data/manuals/MEASystem_Manual.pdf, Abruf: 07.06.2006. Internet
- [133] AYANDA BIOSYSTEMS SA: *Ayanda[™] MEA Biochips Product Catalog*. Version: 2005. http://www.ayanda-biosys.com/Documents/Ayanda_MEA_Catalog.pdf, Abruf: 04.04.2006. Internet

- [134] OKA, Hiroaki; SHIMONO, Ken; OGAWA, Ryuta; SUGIHARA, Hirokazu; TAKETANI, Makoto: A new planar multielectrode array for extracellular recording: application to hippocampal acute slice. In: *Journal of Neuroscience Methods* 93 (1999), S. 61–67
- [135] PANASONIC, MED64-SYSTEMS: *Products - MED-Probe*. http://www.med64.com/ver2/1prod/prod_medprobe.html, Abruf: 04.04.2006. Internet
- [136] UNIVERSITY OF NORTH TEXAS, CENTER FOR NETWORK NEUROSCIENCE: *Technology, Micro Electrode Arrays and Accessoires*. <http://www.cnns.org>, Abruf: 04.04.2006. Internet
- [137] ELUME INC.: *ELume Inc. Innovation Through Differentiation*. <http://www.elume.com/>, Abruf: 26.04.2006. Internet
- [138] ALA SCIENTIFIC INSTRUMENTS: *ALA Scientific Instruments, Electrophysiology*. <http://www.alascience.com/products/electrophysiology.html>, Abruf: 26.04.2006. Internet
- [139] PLEXON INC.: *Multichannel Acquisition Processor (MAP)*. http://plexoninc.com/MAP_Overview.htm, Abruf: 07.06.2006. Internet
- [140] *Plexon Catalog Listings*. http://plexoninc.com/catalog/plexon_catalog_top.html, Abruf: 06.05.2007. Internet
- [141] PANASONIC, MED64 SYSTEMS: *Product - MED64 System*. http://www.med64.com/ver2/1prod/prod_med64.html, Abruf: 04.04.2006. Internet
- [142] ALPHA OMEGA: *Microelectrode Recording instruments*. http://www.alphaomega-eng.com/pr_site/Products.pdf, Abruf: 07.06.2006. Internet
- [143] CAMBRIDGE ELECTRONIC DESIGN: *CED Products*. <http://www.ced.co.uk/pru.shtml>, Abruf: 07.06.2006. Internet
- [144] NEURALYNX: *Neuralynx - High Density Electrophysiology Recording Systems*. <http://www.neuralynx.com/Products.asp?Act=Lines>, Abruf: 07.06.2006. Internet
- [145] TUCKER-DAVIS TECHNOLOGIES: *Product Catalog*. www.tdt.com/T2Download/TDTCatalog2006.pdf, Abruf: 07.06.2006. Internet
- [146] NEUROSHARE: *Links to neuroscience data acquisition hardware/software vendors*. <http://neuroshare.sourceforge.net/links.shtml>, Abruf: 09.06.2006. Internet
- [147] ROSENFELD, Azriel; WECHSLER, Harry: Pattern recognition: Historical perspective and future directions. In: *International Journal of Imaging Systems and Technology* 11 (2000), Nr. 2, S. 101–116

- [148] STREIT, Jürg; TSCHERTER, Anne; HEUSCHKEL, Marc O.; RENAUD, Philippe: The generation of rhythmic activity in dissociated cultures of rat spinal cord. In: *European Journal of Neuroscience* 14 (2001), S. 191–202
- [149] REICH, Daniel S.; MECHLER, Ferenc; VICTOR, Jonathan D.: Independent and Redundant Information in Nearby Cortical Neurons. In: *Science* 294 (2001), S. 2566–2568
- [150] *Kapitel Automatic Discrimination of Single Units.* In: WHEELER, Bruce C.: *Methods for Neural Ensemble Recordings.* 1st Edition. CRC-Press, 1998, S. 61–77
- [151] SCHMIDT, Edward M.: Computer separation of multi-unit neuroelectric data: a review. In: *Journal of Neuroscience Methods* 12 (1984), Nr. 2, S. 95–111
- [152] LEWICKI, M. S.: A review of methods for spike sorting: the detection and classification of neural action potentials. In: *Network: Comput. Neural Syst.* 9 (1998), Nr. 4, S. R53–R78. – 0954-898x Journal Article Review Review, Tutorial
- [153] ATIYA, Amir F.: Recognition of Multiunit Neural Signals. In: *IEEE Transactions on Biomedical Engineering* 39 (1992), S. 723–729
- [154] CHANDRA, Rishi; OPTICAN, Lance M.: Detection, Classification and Superposition Resolution of Action Potentials in Multiunit Single-Channel Recordings by an On-line Real-Time Neural Network. In: *IEEE Transactions on Biomedical Engineering* 44 (1997), Nr. 5, S. 403–412
- [155] ABELES, Moshe; GOLDSTEIN, Moise H.: Multispikes Train Analysis. In: *Proceedings of the IEEE* 65 (1977), Nr. 5, S. 762–773
- [156] KIM, S; McNAMEES, J; BURCHIEL, K.: Action potential detection with automatic template matching. In: *IEEE International Conference of the Engineering in Medicine and Biology Society* Bd. 1, 2004, S. 41–44
- [157] *Kapitel Multielectrode Recording from the Cerebellum.* In: WELSH, John P.; SCHWARZ, Cornelius: *Methods for Neural Ensemble Recordings.* CRC Press, 1998. – ISBN 0849333512, S. 79–100
- [158] STRUZIK, Zbigniew R.: A few remarks on the analysis of physiological data for ubiquitous medicine. In: *International Congress Series* 1287 (2006), S. 219–224
- [159] YANG, Xiaowei; SHAMMA, Shihab A.: A totally automated system for the detection and classification of neural spikes. In: *IEEE Transactions on Biomedical Engineering* 35 (1988), Nr. 10, S. 806–816
- [160] HULATA, E.; SEGEV, R.; SHAPIRA, Y.; BENVENISTE, M.; BEN-JACOB, E.: Detection and sorting of neural spikes using wavelet packets. In: *Phys Rev Lett* 85 (2000), Nr. 21, S. 4637–40
- [161] HULATA, Eyal; SEGEV, Ronen; BEN-JACOB, Eshel: A method for spike sorting and detection based on wavelet packets and Shannon's mutual information. In: *Journal of Neuroscience Methods* 117 (2002), Nr. 1, S. 1–12

- [162] FOLKERS, Andre; JANNASCH, Steffi; HOFMANN, Ulrich G.: Lifting Scheme - An Alternative to Wavelet Transforms for Real Time Applications. In: *Global DSP 2* (2003), Nr. 12, S. 1–4
- [163] QUIROGA, R. Q.; NADASDY, Z.; BEN-SHAUL, Y.: Unsupervised Spike Detection and Sorting with Wavelets and Superparamagnetic Clustering. In: *Neural Computing* 16 (2004), Nr. 8, S. 1661–1687
- [164] NENADIC, Zoran; BURDICK, Joel W.: Spike Detection Using the Continuous Wavelet Transform. In: *IEEE Transactions on Biomedical Engineering* 52 (2005), Nr. 1, S. 74–78
- [165] KIM, Kyung H.; KIM, Sung J.: A wavelet-based method for action potential detection from extracellular neural signal recording with low signal-to-noise ratio. In: *IEEE Transactions on Biomedical Engineering* 50 (2003), Nr. 8, S. 999–1011
- [166] KIM, Dohoon; CHOI, Joon H.; KIM, Taejeong: A Wavelet(MZ-DWT) Based Action Potential Detector at Low Signal-to-Noise Ratios. In: *International IEEE EMBS Conference on Neural Engineering*. Washington D.C., USA, 2005, S. 301–303
- [167] OWEISS, Karim G.; ANDERSON, David J.: A Multiresolution Generalized Maximum Likelihood Approach for the Detection of Unknown Transient Multichannel Signals in Colored Noise with Unknown Covariance. In: *IEEE International Conference on Acoustics, Speech, and Signal Processing*, 2002, S. 2993–2996
- [168] SUHAIL, Yasir; OWEISS, Karim G.: Multiresolution Bayesian Detection of Multiunit Extracellular Spike Waveforms in Multichannel Neuronal Recordings. In: *IEEE Conference on Engineering in Medicine and Biology*, 2005
- [169] BANKMAN, Isaac N.; JOHNSON, Kenneth O.; SCHNEIDER, Wolfger: Optimal Detection, Classification and Superposition Resolution in Neural Waveform Recordings. In: *IEEE Transactions on Biomedical Engineering* 40 (1993), S. 836–840
- [170] HARRIS, Kenneth D.; HENZE, Darrell A.; CSICSVARI, Jozsef; HIRASE, Hajime; BUZSAKI, Gyorgy: Accuracy of Tetrode Spike Separation as Determined by Simultaneous Intracellular and Extracellular Measurements. In: *Journal of Neurophysiology* 84 (2000), Nr. 1, S. 401–414
- [171] KAISER, J. F.: On a simple algorithm to calculate the 'energy' of a signal. In: *International Conference on Acoustics, Speech and Signal Processing (ICASSP)*, 1990, S. 381–384
- [172] KIM, Kyung H.; KIM, Sung J.: Neural spike sorting under nearly 0-dB signal-to-noise ratio using nonlinear energy operator and artificial neural-network classifier. In: *IEEE Transactions on Biomedical Engineering* 47 (2000), Nr. 10, S. 1406–1411
- [173] CHOI, Joon H.; KIM, Taejeong: Neural action potential detector using multi-resolution TEO. In: *IEE Electronics Letters* 38 (2002), Nr. 12, S. 541–543

- [174] MARION-POLL, Frederic; TOBIN, Thomas R.: Software filter for detecting spikes superimposed on a fluctuating baseline. In: *Journal of Neuroscience Methods* 37 (1991), Nr. 1, S. 1–6
- [175] SOTO, Enrique; SALCEDA, Emilio; CRUZ, Ricardo; ORTEGA, Aida; VEGA, Rosario: Microcomputer program for automated action potential waveform analysis. In: *Computer Methods and Programs in Biomedicine* 62 (2000), S. 141–144
- [176] AKSENOVA, Tetyana I.; CHIBIROVA, Olga K.; DRYGA, Oleksandr A.; TETKO, Igor V.; BENABID, Alim-Louis; VILLA, Alessandro E. P.: An unsupervised automatic method for sorting neuronal spike waveforms in awake and freely moving animals. In: *Methods* 30 (2003), Nr. 2, S. 178–187
- [177] SOTO, Enrique; MANJARREZ, Elias; VEGA, Rosario: A microcomputer program for automated neuronal spike detection and analysis. In: *International Journal of Medical Informatics* 44 (1997), Nr. 3, S. 203–212
- [178] HARRISON, Reid R.: A Low-Power Integrated Circuit for Adaptive Detection of Action Potentials in Noisy Signals. In: *International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society* Bd. 4, 2003, S. 3325–3328
- [179] WATKINS, Paul T.; SANTHANAM, Gopal; SHENOY, Krishna V.; HARRISON, Reid R.: Validation of Adaptive Threshold Spike Detector for Neural Recording. In: *International Conference of the IEEE EMBS*, 2004, S. 4079–4082
- [180] SAHANI, Maneesh: *Latent Variable Models for Neural Data Analysis*, California Institute of Technology, PhD thesis, 1999
- [181] ZVIAGINTSEV, Alex; PERELMAN, Yevgeny; GINOSAR, Ran: Algorithms and Architectures for Low Power Spike Detection and Alignment. In: *Journal of Neural Engineering* 3 (2006), Nr. 1, S. 35–42
- [182] RUTISHAUSER, Ueli; SCHUMAND, Erin M.; MAMELAK, Adam N.: Online detection and sorting of extracellularly recorded action potentials in human medial temporal lobe recordings, in vivo. In: *Journal of Neuroscience Methods* 154 (2006), S. 204–224
- [183] JUNG, Hae K.; CHOI, Joon H.; KIM, Taejeong: Solving alignment problems in neural spike sorting using frequency domain PCA. In: *Neurocomputing* 69 (2006), S. 975–978
- [184] ZVIAGINTSEV, A.; PERELMAN, Y.; GINOSAR, R.: A Low-Power Spike Detection and Alignment Algorithm. In: *International IEEE EMBS Conference on Neural Engineering*, 2005, S. 317–320
- [185] HAAS, Alfred M.; COHEN, Marc H.; ABSHIRE, Pamela A.: Real-time variance based template matching spike sorting system. In: *IEEE / NIH Life Science Systems and Applications Workshop LISA*, 2007, S. 104–107

- [186] NICOLELIS, Miguel A. L.; GHAZANFAR, Asif A.; FAGGIN, Barbara M.; VOTAW, Scott; OLIVEIRA, Laura M. O.: Reconstructing the Engram: Neurotechnique Simultaneous, Multisite, Many Single Neuron Recordings. In: *Neuron* 18 (1997), S. 529–537
- [187] DELESCLUSE, Matthieu; POUZAT, Christophe: Efficient spike-sorting of multi-state neurons using inter-spike intervals information. In: *Journal of Neuroscience Methods* 150 (2006), Nr. 1, S. 16–29
- [188] RINBERG, D.; BIALEK, W.; DAVIDOWITZ, H.; TISHBY, N.: Spike sorting in the frequency domain with overlap detection / ArXiv Physics e-prints. 2003. – Forschungsbericht
- [189] DINNING, G. J.; SANDERSON, A. C.: Real-time classification of multiunit neural signals using reduced feature sets. In: *IEEE Transactions on Biomedical Engineering* 28 (1981), Nr. 12, S. 804–812
- [190] BIERER, Steven M.; ANDERSON, David J.: Multi-channel spike detection and sorting using an array processing technique. In: *Neurocomputing* 26 (1999), S. 947–956
- [191] MUSIAL, P. G.; BAKER, S. N.; GERSTEIN, G. L.; KING, E. A.; KEATING, J. G.: Signal-to-noise ratio improvement in multiple electrode recording. In: *Journal of Neuroscience Methods* 115 (2002), Nr. 1, S. 29–43
- [192] TAKAHASHI, Susumu; SAKURAI, Yoshio; TSUKADA, Minoru; ANZAI, Yuichiro: Classification of neuronal activities from tetrode recordings using independent component analysis. In: *Neurocomputing* 49 (2002), Nr. 1-4, S. 289–298
- [193] HERMLE, Thomas; SCHWARZ, Cornelius; BOGDAN, Martin: Employing ICA and SOM for spike sorting of multielectrode recordings from CNS. In: *Journal of Physiology-Paris* 98 (2004), Nr. 4-6, S. 349–356
- [194] LETELIER, Juan C.; WEBER, Pamela P.: Spike sorting based on discrete wavelet transform coefficients. In: *Journal of Neuroscience Methods* 101 (2000), Nr. 2, S. 93–106
- [195] ZOURIDAKIS, George; TAM, David C.: Multi-unit spike discrimination using wavelet transforms. In: *Computers in Biology and Medicine* 27 (1997), Nr. 1, S. 9–18
- [196] OWEISS, Karim G.; ANDERSON, David J.: Spike sorting: a novel shift and amplitude invariant technique. In: *Neurocomputing* 44-46 (2002), S. 1133–1139
- [197] STITT, J. P.; GAUMOND, R. P.; FRAZIER, J. L.; HANSON, F. E.: An Artificial Neural Network for Neural Spike Classification. In: *IEEE Northeast Bioengineering Conference*, 1997, S. 15–16
- [198] ZVIAGINTSEV, A.; PERELMAN, Y.; GINOSAR, Ran: Low Power Architectures for Spike Sorting. In: *International IEEE EMBS Conference on Neural Engineering*, 2005, S. 162–165
- [199] ZUMSTEG, Zachary S.; AHMED, Rizwan E.; SANTHANAM, Gopal; SHENOY, Krishna V.; MENG, Teresa H.: Power Feasibility of Implantable Digital Spike-Sorting Circuits for Neural Prosthetic Systems. In: *International Conference of the IEEE EMBS*, 2004, S. 4237–4240

- [200] ZUMSTEG, Zachary S.; KEMERE, Caleb; O'DRISCOLL, Stephen; SANTHANAM, Gopal; AHMED, Rizwan E.; SHENOY, Krishna V.; MENG, Teresa H.: Power Feasibility of Implantable Digital Spike Sorting Circuits for Neural Prosthetic Systems. In: *IEEE Transactions On Neural Systems And Rehabilitation Engineering* 13 (2005), Nr. 3, S. 272–279
- [201] D'HOLLANDER, E. H.; ORBAN, G. A.: Spike recognition and on-line classification by unsupervised learning system. In: *IEEE Transactions on Biomedical Engineering* 26 (1979), Nr. 5, S. 279–84
- [202] MONTGOMERY, Jr Erwin B.; HUANG, He; ASSADI, Amir: Unsupervised clustering algorithm for N-dimensional data. In: *Journal of Neuroscience Methods* 144 (2005), Nr. 1, S. 19–24
- [203] ATIYA, Amir F.; BOWER, James M.: Optimal Neural Spike Classification. In: *Neural Information Processing Systems*. Denver, USA : American Institute of Physics, 1987, S. 95–102
- [204] SALGANICOFF, M.; SARNA, M.; SAX, L.; GERSTEIN, G. L.: Unsupervised waveform classification for multi-neuron recordings: a real-time, software-based system. I. Algorithms and implementation. In: *Journal of Neuroscience Methods* 25 (1988), Nr. 3, S. 181–187
- [205] SARNA, M. F.; GOCHIN, P.; KALTENBACH, J.; SALGANICOFF, M.; GERSTEIN, G. L.: Unsupervised waveform classification for multi-neuron recordings: a real-time, software-based system. II. Performance comparison to other sorters. In: *Journal of Neuroscience Methods* 25 (1988), Nr. 3, S. 189–196
- [206] LEWICKI, Michael S.: Bayesian Modeling and Classification of Neural Signals. In: *Neural Comp.* 6 (1994), S. 1005–1030
- [207] POUZAT, Christophe; MAZOR, Ofer; LAURENT, Gilles: Using noise signature to optimize spike-sorting and to assess neuronal classification quality. In: *Journal of Neuroscience Methods* 122 (2002), Nr. 1, S. 43–57
- [208] SHOHAM, Shy; FELLOWS, Matthew R.; NORMANN, Richard A.: Robust, automatic spike sorting using mixtures of multivariate t-distributions. In: *Journal of Neuroscience Methods* 127 (2003), Nr. 2, 111–122. http://www.bm.technion.ac.il/niel/index_files/soft.htm
- [209] WOOD, E.; FELLOWS, M.; DONOGHUE, J.R.; BLACK, M.J.: Automatic spike sorting for neural decoding. In: *IEEE Engineering in Medicine and Biology Society Bd. 2*, 2004, S. 4009–4012
- [210] FEE, Michale S.; MITRA, Partha P.; KLEINFELD, David: Automatic sorting of multiple unit neuronal signals in the presence of anisotropic and non-Gaussian variability. In: *Journal of Neuroscience Methods* 69 (1996), Nr. 2, S. 175–188
- [211] KANEKO, Hidekazu; SUZUKI, Shinya S.; OKADA, Jiro; AKAMATSU, Motoyuki: Multineuronal Spike Classification Based on Multisite Electrode Recording, Whole-Waveform

- Analysis and Hierarchical Clustering. In: *IEEE Transactions on Biomedical Engineering* 46 (1999), S. 280–290
- [212] ZOURIDAKIS, George; TAM, David C.: Identification of reliable spike templates in multi-unit extracellular recordings using fuzzy clustering. In: *Computer Methods and Programs in Biomedicine* 61 (2000), Nr. 2, S. 91–98
- [213] CHOI, Joon H.; KIM, Dohoon; KIM, Taejeong: A new overlapping resolution method for multi-channel spike sorting. In: *International IEEE EMBS Conference on Neural Engineering*. Washington D.C., USA : IEEE, 2005, S. 683–686
- [214] *Kapitel Ziele unüberwachten Lernens*. In: FRITZKE, Bernd: *Vektorbasierte Neuronale Netze*. Shaker Verlag, 1998, 37–44
- [215] *Kapitel Clustering, Distance Methods and Ordination*. In: JOHNSON, Richard A.; WICHERN, Dean W.: *Applied Multivariate Statistical Analysis*. 4. Prentice Hall, 1998, S. 726–799
- [216] *Kapitel Classification and Clustering*. In: KENDALL, Maurice: *Multivariate Analysis*. 2. Charles Griffin & Company Ltd., 1980, S. 31–46
- [217] *Kapitel Data Types and Data Structures*. In: JAIN, Anil K.; DUBES, Richard C.: *Algorithms for Clustering Data*. Prentice Hall, 1988, S. 8–14
- [218] *Kapitel Unsupervised Learning and Clustering*. In: DUDA, Richard O.; HART, Peter E.; STORK, David G.: *Pattern Classification*. 2nd. Wiley & Sons Inc., 2001. – ISBN 0471056693, S. 517–600
- [219] BILMES, Jeff A.: A Gentle Tutorial of the EM Algorithm and its Application to Parameter Estimation for Gaussian Mixture and Hidden Markov Models / International Computer Science Institute Berkeley. 1998. – Forschungsbericht
- [220] GUILLORY, K. S.; NORMANN, R. A.: A 100-channel system for real time detection and storage of extracellular spike waveforms. In: *Journal of Neuroscience Methods* 91 (1999), Nr. 1-2, S. 21–29
- [221] WEBER, B.; MALINA, T.; MENNE, K.; METZLER, V.; FOLKERS, A.; HOFMANN, U. G.: Handling large files of multisite microelectrode recordings for the European VSAMUEL consortium. In: *Neurocomputing* 38-40 (2001), S. 1725–1734
- [222] FORSTER, Clemens; HANDWERKER, Hermann O.: Automatic classification and analysis of microneurographic spike data using a PC/AT. In: *Journal of Neuroscience Methods* 31 (1990), Nr. 2, S. 109–118
- [223] JANSEN, Rene F.; TER MAAT, Andries: Automatic wave form classification of extracellular multineuron recordings. In: *Journal of Neuroscience Methods* 41 (1992), Nr. 2, S. 123–132

- [224] POINDESSAULT, Jean-Pierre; BEAUQUIN, Christophe; GAILLARD, Frederic: Stimulation, data acquisition, spikes detection and time/rate analysis with a graphical programming system: an application to vision studies. In: *Journal of Neuroscience Methods* 59 (1995), Nr. 2, S. 225–235
- [225] PETERSON, Bret E.; MERZENICH, Michael M.: EXP: a Macintosh program for automating data acquisition and analysis applied to neurophysiology. In: *Journal of Neuroscience Methods* 57 (1995), Nr. 2, S. 121–131
- [226] COCATRE-ZILGIEN, Jan H.; DELCOMYN, Fred: A slope-based approach to spike discrimination in digitized data. In: *Journal of Neuroscience Methods* 33 (1990), Nr. 2-3, S. 241–249
- [227] SEGEV, Ronen; GOODHOUSE, Joe; PUCHALLA, Jason; BERRY II, Michael J.: Recording spikes from a large fraction of the ganglion cells in a retinal patch. In: *Nature Neuroscience* 7 (2004), S. 1155–1162
- [228] STEWART, C.M.; NEWLANDS, S.D.; PERACHIO, A.A.: Spike detection, characterization, and discrimination using feature analysis software written in LabVIEW. In: *Computer Methods and Programs in Biomedicine* 76 (2004), S. 239–251
- [229] STITT, J.P.: Action Potential Classifiers: A Functional Comparison of Template Matching, Principal Components Analysis, and an Artificial Neural Network. In: *Chemical Senses* 23 (1998), S. 531–539
- [230] POUZAT, Christophe; DELESCLUSE, Matthieu; VIOT, Pascal; ; DIEBOLT, Jean: Improved Spike-Sorting By Modeling Firing Statistics and Burst-Dependent Spike Amplitude Attenuation: A Markov Chain Monte Carlo Approach. In: *Journal of Neurophysiology* 91 (2004), S. 2910–2928
- [231] TURNQUIST, Brian; LEVERENTZ, Mark; SWANSON, Erin: Neural spike classification using parallel selection of all algorithm parameters. In: *Journal of Neuroscience Methods* 137 (2004), Nr. 2, S. 291–298
- [232] SNIDER, R. K.; BONDS, A. B.: Classification of non-stationary neural signals. In: *Journal of Neuroscience Methods* 84 (1998), Nr. 1-2, S. 155–166
- [233] *Kapitel Closing The Loop: Stimulation Feedback Systems for Embodied MEA Cultures*. In: POTTER, Steve M.; WAGENAAR, Daniel A.; DEMARSE, Thomas B.: *Advances in Network Electrophysiology Using Multi-Electrode Arrays*. Springer Verlag, 2006, S. 215–242
- [234] Schutzrecht 4,603,703 (August 1986). MCGILL, Kevin C.; DORFMAN, Leslie J. (Erfinder).
- [235] BERGMAN, Hagai; DELONG, Mahlon R.: A personal computer-based spike detector and sorter: implementation and evaluation. In: *Journal of Neuroscience Methods* 41 (1992), Nr. 3, S. 187–197

- [236] ÖHBERG, F.; JOHANSSON, H.; BERGENHEIM, M.; PEDERSEN, J.; DJUPSJÖBACKA, M.: A neural network approach to real-time spike discrimination during simultaneous recording from several multi-unit nerve filaments. In: *Journal of Neuroscience Methods* 64 (1996), S. 181–187
- [237] OGHALAI, John S.; STREET, W. N.; RHODE, William S.: A neural network-based spike discriminator. In: *Journal of Neuroscience Methods* 54 (1994), S. 9–22
- [238] GÄDICKE, Rainer; ALBUS, Klaus: Real-time separation of multineuron recordings with a DSP32C signal processor. In: *Journal of Neuroscience Methods* 57 (1995), Nr. 2, S. 187–193
- [239] GRAMOWSKI, Alexandra; RICHTER, Claudia; KLETZIN, Frank; NÖLDGE-SCHOMBURG, Gabriele; WEISS, Dieter: Dose-dependent effects of the anaesthetic ketamine on the electrical activity of primary frontal cortex networks. In: *International MEA Meeting NMI Reutlingen, BIOPRO Baden-Württemberg, 2004*, 57
- [240] MONTGOMERY, Jr Erwin B.; GALE, John T.; HUANG, He: Methods for isolating extracellular action potentials and removing stimulus artifacts from microelectrode recordings of neurons requiring minimal operator intervention. In: *Journal of Neuroscience Methods* 144 (2005), Nr. 1, S. 107–125
- [241] SMITH, Scott R.; WHEELER, Bruce C.: A Real-Time Multiprocessor System for Acquisition of Multichannel Neural Data. In: *IEEE Transactions on Biomedical Engineering* 35 (1988), S. 875–877
- [242] CHIBIROVA, Olga K.; AKSENOVA, Tetyana I.; BENABID, Alim-Louis; CHABARDES, Stephan; LAROUCHE, Steeve; ROUAT, Jean; VILLA, Alessandro E. P.: Unsupervised Spike Sorting of extracellular electrophysiological recording in subthalamic nucleus of Parkinsonian patients. In: *Biosystems* 79 (2005), Nr. 1-3, S. 159–171
- [243] LAUBACH, M.: Verifying neural codes: the statistical pattern recognition approach. In: *International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society* Bd. 3, 2003, S. 2147–2150
- [244] GHOLMIEH, Ghassan; COURELLIS, Spiros; DIMOKA, Angelika; WILLS, Jack D.; LACoss, Jeff; GRANACKI, John J.; MARMARELIS, Vasilis; BERGER, Theodore: An algorithm for real-time extraction of population EPSP and population spike amplitudes from hippocampal field potential recordings. In: *Journal of Neuroscience Methods* 136 (2004), Nr. 2, S. 111–121
- [245] EGERT, U.; KNOTT, Th; SCHWARZ, C.; NAWROT, M.; BRANDT, A.; ROTTER, S.; DIEMANN, M.: MEA-Tools: an open source toolbox for the analysis of multi-electrode data with Matlab. In: *Journal of Neuroscience Methods* 117 (2002), Nr. 1, S. 33–42
- [246] VATO, A.; BONZANO, L.; CHIAPPALONE, M.; CICERO, S.; MORABITO, F.; NOVELLINO, A.; STILLO, G.: Spike manager: a new tool for spontaneous and evoked neuronal networks activity characterization. In: *Neurocomputing* 58-60 (2004), S. 1153–1161

- [247] DELORME, Arnaud; MAKEIG, Scott: EEGLAB: an open source toolbox for analysis of single-trial EEG dynamics including independent component analysis. In: *Journal of Neuroscience Methods* 134 (2004), S. 9–21
- [248] POUZAT, Christophe: *SpikeOMatic Home Page*. http://www.biomedicale.univ-paris5.fr/phycserv/C_Pouzat/SOM.html#environment, Abruf: 12.06.2006. Internet
- [249] BERENGUER, V.; BONGARD, M.: *neurALC*. Version:2005. <http://neuralc.sourceforge.net/>, Abruf: 12.06.2006. Internet
- [250] FERNANDEZ, Prof. Dr. E.; BONGARD, Markus: *an open-source software for the analysis of multi-electrode recordings*. Institute of Bioengineering, University Miguel Hernandez, Alicante (Spain), August 2006. <http://neuralc.sourceforge.net/files/neurALC-Manual.pdf>
- [251] BONGARD, M.; MICOL, D.: *NEV2lKIT - a tool for handling neuronal event files*. Version:2004. <http://nev2lkit.sourceforge.net/manual/Nev2lKit-Manual.html>, Abruf: 12.06.2006. Internet
- [252] WAGENAAR, Daniel A.; POTTER, Steve M.: A versatile all-channel stimulator for electrode arrays, with real-time control. In: *Journal of Neural Engineering* 1 (2004), Nr. 1, S. 39–45
- [253] UNIVERSITY OF SOUTHERN CALIFORNIA: *DataMunch*. Version:1999. <http://www-hbp.usc.edu/Projects/datamunch.htm>, Abruf: 09.06.2006. Internet
- [254] NEUROSHARE: *Open data specifications and software for neurophysiology*. <http://neuroshare.sourceforge.net/index.shtml>, Abruf: 07.06.2006. Internet
- [255] R.C. ELECTRONICS INC.: *NeuroMAX - A software toolbox for the analysis of multichannel, multielectrode signals*. <http://neuromax.org/>, Abruf: 07.06.2006. Internet
- [256] SCHLOEGL, Alois: *The BioSig Project*. <http://biosig.sourceforge.net/>, Abruf: 12.06.2006. Internet
- [257] BONOMINI, María P.; FERRANDEZ, José M.; BOLEA, Jose A.; FERNANDEZ, Eduardo: DATA-MEAns: An open source tool for the classification and management of neural ensemble recordings. In: *Journal of Neuroscience Methods* 148 (2005), S. 137–146
- [258] REBRIK, Sergei: *Spiker - a free GUI program for tetrode spike clustering*. <http://millerlab.ucsf.edu/Software/Spiker/spiker.html>, Abruf: 12.06.2006. Internet
- [259] HARRIS, Ken: *KlustaKwik*. Version:2002. <http://klustakwik.sourceforge.net/>, Abruf: 12.06.2006. Internet
- [260] HAZAN, Lynn: *Klusters*. <http://klusters.sourceforge.net/>, Abruf: 12.06.2006. Internet

- [261] HAZAN, Lynn; ZUGARO, Michaël; BUZSÁKI, György: Klusters, NeuroScope, NDManager: A free software suite for neurophysiological data processing and visualization. In: *Journal of Neuroscience Methods* 155 (2006), S. 207–216
- [262] REDISH, A. D.: *MClust - Free-ware spike sorting*. Version: 2005. <http://ccgb.umn.edu/~redish/mclust/>, Abruf: 12.06.2006. Internet
- [263] FRALEY, Chris; RAFTERY, Adrian: *MCLUST: Software for Normal Mixture Modeling and Model-Based Clustering*. Version: 2006. <http://www.stat.washington.edu/mclust/>, Abruf: 04.05.2007. Internet
- [264] FRALEY, Chris; RAFTERY, Adrian E.: *MCLUST Version 3: An R Package for Normal Mixture Modeling and Model-Based Clustering* / Department of Statistics, University of Washington. Version: 2006. <http://www.stat.washington.edu/fraley/mclust/home.html>. 2006 (504). – Forschungsbericht
- [265] PLEXON INC.: *MAP System Control Software - "RASPUTIN"*. Version: März 2006. <http://plexoninc.com/MCP.htm>, Abruf: 05.04.2006. Internet
- [266] PLEXON INC.: *Offline Sorter - Multiple Techniques for Sorting Electrodes and Tetrodes*. <http://plexoninc.com/OFS.htm>, Abruf: 07.06.2006. Internet
- [267] VOLDMAN, Joel; GRAY, Martha L.; SCHMIDT, Martin A.: Microfabrication in Biology and Medicine. In: *Annual Review of Biomedical Engineering* 1 (1999), S. 401–425
- [268] BRISCHWEIN, Martin; GEISLER, Thomas; LOB, Volker; RESSLER, Johann; WIEST, Joachim; WOLF, Bernhard: Chip statt Maus: Mikrosensorarrays zur Chemikalienprüfung. In: *Nachrichten aus der Chemie* 54 (2006), S. 115–120
- [269] HEER, F.; HAFIZOVIC, S.; FRANKS, W.; UGNIWENKO, T.; BLAU, A.; ZIEGLER, C.; HIERLEMANN, A.: CMOS microelectrode array for bidirectional interaction with neuronal networks. In: *IEEE Journal of Solid State Circuits* 41 (2006), Nr. 7, S. 1620–1629
- [270] KOVACS, Gregory T. A.: Electronic Sensors with Living Cellular Components. In: *Proceedings of the IEEE* 91 (2003), Nr. 6, S. 915–929
- [271] WERDICH, Andreas A.; LIMA, Eduardo A.; IVANOV, Borislav; GES, Igor; ANDERSON, Mark E.; WIKSWO, John P.; BAUDENBACHER, Franz J.: A microfluidic device to confine a single cardiac myocyte in a sub-nanoliter volume on planar microelectrodes for extracellular potential recordings. In: *Miniaturisation for Chemistry, Biology and Bioengineering, LabChip* 4 (2004), S. 357–362
- [272] *Kapitel Analysis of Cardiac Myocyte Activity Dynamics with Micro-Electrode Arrays*. In: EGERT, Ulrich; BANACH, Kathrin; MEYER, Thomas: *Advances in Network Electrophysiology Using Multi-Electrode Arrays*. Springer, 2006, S. 274–290
- [273] LIND, R.; CONNOLLY, P.; WILKINSON, C. D. W.; THOMSON, R. D.: Finite-element analysis applied to extracellular microelectrode design. In: *Sensors and Actuators B* 3 (1991), Nr. 1, S. 23–30

- [274] ERICKSON, Jon; TOOKER, Angela; PINE, Jerry: Caged Neuron MEA. In: *International MEA Meeting* NMI Reutlingen, BIOPRO Baden-Württemberg, 2004, 52–53
- [275] WILKINSON, C.D.W.: Making Structures for Cell Engineering. In: *European Cells and Mate* 8 (2004), S. 21–26
- [276] WILKINSON, Chris; CURTIS, Adam: Networks of living cells. In: *Physics World* 12 (1999), Nr. 9, S. 45–48
- [277] SMITH, Leslie S.; MTETWA, Nhamoinesu: A tool for synthesizing spike trains with realistic interference. In: *Journal of Neuroscience Methods* 159 (2007), Nr. 1, S. 170–180
- [278] LI, Nianzhen; TOUROVSKAIA, Anna; FOLCH, Albert: Biology on a Chip: Microfabrication for Studying the Behavior of Cultured Cells. In: *Critical Reviews in Biomedical Engineering*, 31 (2003), Nr. 5-6, S. 423–488
- [279] UROUKOV, Ivan S.; MA, Mingwen; BULL, Larry; PURCELL, Wendy M.: Electrophysiological measurements in three-dimensional in vivo-mimetic organotypic cell cultures: Preliminary studies with hen embryo brain spheroids. In: *Neuroscience Letters* 404 (2006), S. 33–38
- [280] INGEBRANDT, Sven; WROBEL, Günter; ZHANG, Yi; MEYBURG, Sven; SCHINDLER, Mathias; SOMMERHAGE, Frank; BORSTLAP, Dirk; OFFENHÄUSSER, Andreas: Investigations of extracellular signal shapes recorded by planar metal microelectrodes and field-effect transistors. In: *IEEE Conference on Sensors*, 2005, S. 611–616
- [281] OBEID, Iyad; WOLF, Patrick D.: Evaluation of Spike-Detection Algorithms for a Brain-Machine Interface Application. In: *IEEE Transactions on Biomedical Engineering* 51 (2004), Nr. 6, S. 905–911
- [282] MTETWA, Nhamoinesu; SMITH, Leslie S.: Smoothing and thresholding in neuronal spike detection. In: *Neurocomputing* 69 (2006), S. 1366–1370
- [283] WILSON, Scott B.; EMERSON, Ronald: Spike detection: a review and comparison of algorithms. In: *Clinical Neurophysiology* 113 (2002), S. 1873–1881
- [284] REAZ, M. B. I.; HUSSAIN, M. S.; MOHD-YASIN, F.: Techniques of EMG signal analysis: detection, processing, classification and applications. In: *Biological Procedures Online* 8 (2006), Nr. 1, S. 11–35
- [285] WON, Deborah S.; WOLF, Patrick D.: A simulation study of information transmission by multi-unit microelectrode recordings. In: *Network: Computation in Neural Systems* 15 (2004), S. 29–44
- [286] WON, Deborah S.; CHONG, David Y.; WOLF, Patrick D.: Effects of Spike Sorting Error on Information Content in Multi-Neuron Recordings. In: *International IEEE EMBS Conference on Neural Engineering*, 2003

- [287] *Kapitel Design Principles of a Neuromotor Prosthetic Device*. In: SERRUYA, Mijail; DONOGHUE, John: *Neuroprosthetics: Theory and Practice*. World Scientific, 2004 (Bioengineering and Biomedical Engineering - Vol. 2). – ISBN 9812380221, S. 1158–1196
- [288] SUNER, Selim; FELLOWS, Matthew R.; VARGAS-IRWIN, Carlos; NAKATA, Gordon K.; DONOGHUE, John P.: Reliability of Signals From a Chronically Implanted, Silicon-Based Electrode Array in Non-Human Primate Primary Motor Cortex. In: *IEEE Transactions on Neural Systems and Rehabilitation Engineering* 13 (2005), Nr. 4, S. 524–541
- [289] DAVIS, Jason: *Comparison of Three Spike-Sorting Algorithms with Simulated Data*, California Institute of Technology, Masterarbeit, 2000
- [290] RODRIGUEZ, David J.: *Clustering Spikes in Multi-unit Neural Signals into Dominant and Remainder Classes*, Duke University, Pratt School of Engineering, Department of Electrical and Computer Engineering, Masterarbeit, 2006
- [291] BUZSÁKI, György: Large-scale recording of neuronal ensembles. In: *Nature Neuroscience* 7 (2004), Nr. 5, S. 446–451
- [292] WHEELER, Bruce C.; HEETDERKS, William J.: A Comparison of Techniques for Classification of Multiple Neural Signals. In: *IEEE Transactions on Biomedical Engineering* 29 (1982), Nr. 12, S. 752–759
- [293] MAIO, Vito D.; MARCIANO, Fortunato: Automativ Classification of Neural Spike Activity: An Application of Minimum Distance Classifiers. In: *Cybernetics and Systems* 34 (2003), S. 173–192
- [294] KREITER, Andreas K.; AERTSEN, Ad M. H. J.; GERSTEIN, George L.: A low-cost single-board solution for real-time, unsupervised waveform classification of multineuron recordings. In: *Journal of Neuroscience Methods* 30 (1989), Nr. 1, S. 59–69
- [295] VOLLGRAF, Roland; MUNK, Matthias; OBERMAYER, Klaus: Optimal filtering for spike sorting of multi-site electrode recordings. In: *Network: Computation in Neural Systems* 16 (2005), Nr. 1, S. 85–113
- [296] VOLLGRAF, Roland; MUNK, Matthias; OBERMAYER, Klaus: Spike Sorting of Multi-Site Electrode Recordings Based on Amplitude Ratios. In: *German Neuroscience Society, Göttingen Neurobiology Conference (NWG)*, 2005
- [297] SIM, A.W.K.; JIN, L.W. C.T. and C. C.T. and Chan; LEONG, P.H.W.: A Comparison of Methods for Clustering of Electrophysiological Multineuron Recordings. In: *International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society* Bd. 20, 1998
- [298] HOFMANN, Ulrich G.; FOLKERS, Andre; MÖSCH, Florian; MALINA, Thomas; MENNE, Kerstin M.; BIELLA, Gerardo; FAGERSTEDT, Patriq; DESCHUTTER, Erik; JENSEN, Winnie; YOSHIDA, Ken; HOEHL, Dirk; THOMAS, Uwe; KINDLUNDH, Maria G.; NORLIN, Peter; CURTIS,

- Marco de: A novel high channel-count system for acute multi-site neuronal recordings. In: *IEEE Transactions on Biomedical Engineering* 53 (2006), S. 1672–1677. – In: *Transactions on Biomedical Engineering*
- [299] PAVLOV, Alexey; MAKAROV, Valeri A.; MAKAROVA, Ioulia; ; PANETSOS, Fivos: Separation of Extracellular Spikes: When Wavelet Based Methods Outperform the Principle Component Analysis. In: MIRA, J. (Hrsg.); ÁLVAREZ, J.R. (Hrsg.): *Mechanisms, Symbols, and Models Underlying Cognition: First International Work-Conference on the Interplay Between Natural and Artificial Computation, IWINAC 2005*, Springer-Verlag, 2005 (Lecture Notes in Computer Science), S. 123–132
- [300] MCGILL, Kevin C.; DORFMAN, Leslie J.: High-Resolution Alignment of Sampled Waveforms. In: *IEEE Transactions on Biomedical Engineering* 31 (1984), Nr. 6, S. 462–468
- [301] WHEELER, B. C.; SMITH, S. R.: High-resolution alignment of action potential waveforms using cubic spline interpolation. In: *Journal of Biomedical Engineering* 10 (1988), Nr. 1, S. 47–53
- [302] BLANCHE, Timothy J.; SWINDALE, Nicholas V.: Nyquist interpolation improves neuron yield in multiunit recordings. In: *Journal of Neuroscience Methods* 155 (2006), S. 81–91
- [303] THAKUR, Pramodsingh H.; LU, Hanzhang; HSIAO, Steven S.; JOHNSON, Kenneth O.: Automated optimal detection and classification of neural action potentials in extracellular recordings. In: *Journal of Neuroscience Methods* 162 (2007), S. 364–376
- [304] BROWN, Emery N.; KASS, Robert E.; MITRA, Partha P.: Multiple neural spike train data analysis: state-of-the-art and future challenges. In: *Nature Neuroscience* 7 (2004), S. 456–461
- [305] GARRETT-MAYER, Elizabeth; PARMIGIANI, Giovanni: Clustering and Classification Methods for Gene Expression Data Analysis / Johns Hopkins University, Dept. of Biostatistics Working Papers. Version: Dezember 2004. <http://www.bepress.com/jhubiostat/paper70>. 2004 (40). – Working Papers
- [306] *Kapitel* How Useful Is Principal Components Analysis? In: HAYKIN, Simon: *Neural Networks - A Comprehensive Foundation*. Prentice Hall, 1994, S. 392–394
- [307] MENNE, Kerstin M. L.; FOLKERS, Andre; MALINA, Thomas; MAEX, Reinoud; HOFMANN, Ulrich G.: Test of spike-sorting algorithms on the basis of simulated network data. In: *Neurocomputing* 44-46 (2002), S. 1119–1126
- [308] WEHR, M.; PEZARIS, J. S.; SAHANI, M.: Simultaneous paired intracellular and tetrode recordings for evaluating the performance of spike sorting algorithms. In: *Neurocomputing* 26-27 (1999), S. 1061–1068
- [309] ESCOLÁ, Ricardo; POUZAT, Christophe; CHAFFIOL, Antoine; YVERT, Blaise; MAGNIN, Isabelle E.; GUILLEMAUD, Régis: SIMONE: A Realistic Neural Network Simulator to Reproduce MEA-Based Recordings. In: *IEEE Transactions on Neural Systems and Rehabilitation Engineering* 16 (2008), Nr. 2, S. 149–160

- [310] SCHROTT, René: *Dokumentation des neuronalen Silizium-Hybrid-Netzwerksensor BISC 0201*. Oktober 2003. – Micronas GmbH, Universität Rostock
- [311] SCHROTT, René; KEUER, Andreas; TAUTORAT, Carsten; KRISCHKER, Detlef; BAUSCH, Gerold; TAUBE, Jan; BEIKIRCH, Helmut; BAUMANN, Werner; SCHREIBER, Erik: Hard- and Software Concept for Real-Time and Embedded Action Potential Analysis. In: *Embedded World Conference*, WEKA Fachzeitschriftenverlag, 2005, S. 327–332
- [312] MORIN, Fabrice O.: Interfacing neuronal microcircuits cultured on microelectrode arrays with pulsed artificial neural networks. In: *International MEA Meeting NMI Reutlingen*, BIOPRO Baden-Württemberg, 2004, 70
- [313] POTTER, Steve M.; WAGENAAR, Daniel A.; MADHAVAN, Radhika; DEMARSE, Thomas B.: Long-Term Bidirectional Neuron Interfaces For Robotic Control and In-Vitro Learning Studies. In: *International IEEE EMBS Conference on Neural Engineering*, 2003
- [314] MARTINOIA, Sergio; NOVELLINO, Antonio; CHIAPPALONE, Michela; D'ANGELO, Paolo; COZZI, Laura; SANGUINETI, Vittorio; BERDONINI, Luca; KOUDELKA-HEP, Milena: A neuro-robotic interface for studying the adaptive properties of cultured neuronal networks. In: *International MEA Meeting NMI Reutlingen*, BIOPRO Baden-Württemberg, 2006. – ISBN 3938345020, 25–26
- [315] SCHROTT, René; BAUSCH, Gerold; KIRCHNER, Klaus-Peter; TAUTORAT, Carsten; BAUMANN, Werner; WEISS, Dieter; BEIKIRCH, Helmut: Evaluation System for Neural Data Acquisition and Analysis. In: *International MEA Meeting NMI Reutlingen*, BIOPRO Baden-Württemberg, 2006. – ISBN 3938345020, 77–78
- [316] TAUTORAT, Carsten: *Dokumentation zur Testschaltung für den Biosensor BISC 0201 und BISC 0202*. Juli 2004. – Bionas GmbH, Universität Rostock
- [317] METEK, Solartron A.: *Frequency Response Analyzers - 1260A Impedance-, Gain-Phase Analyzer*. <http://www.solartronanalytical.com/products/fra/1260a.htm>, Abruf: 05.11.2007. Internet
- [318] NATIONAL INSTRUMENTS: *NI AT-MIO-64E-3, Multifunktions-Datenerfassungsmodul: 500 kS/s, 12 bit, 64 Analogeingänge*. <http://sine.ni.com/nips/cds/view/p/lang/de/nid/11920>, Abruf: 02.11.2007. Internet
- [319] DEGUSSA GALVANOTECHNIK GMBH: *Platin K*. 2003. – Ansatzkonzentrat 250 ml, wässrige Lösung anorganischer Säuren und Salze, enthält Platin und Schwefelsäure, Chargen-Nummer: 100700
- [320] KEUER, Andreas: *Ansteuerung einer Stromquelle für Mikroelektroden-Beschichtungsversuch*. Universität Rostock, 2002. – Dokumentation des LabView-Programms MEB2
- [321] IMFELD, K.; GARENNE, A.; NEUKOM, S.; MACCIONE, A.; MARTINOIA, S.; KOUDELKA-HEP, M.; BERDONINI, L.: High-resolution MEA platform for in-vitro electrogenic cell networks imaging. In: *International Conference of the IEEE EMBS*, 2007, S. 6085–6088

- [322] MÜLLER, Rudolf; HEYWANG, Walter: *Halbleiter-Elektronik Rauschen*. Springer Verlag, 1979. – ISBN 3540093796
- [323] HENSEL ELEKTRONIK GMBH: *Adapterplatine für den neuronalen Sensorchip BISC0201*. 2003. – Feinkonzept, Platine zur Ankopplung des neuronalen Sensorchips BISC0201 an Signalverarbeitungskarten vom Typ LAURA
- [324] BIONAS GMBH: *Bionas[®] NSX sensor interface SI 58*. Version: 2005. <http://bionas.de/Downloads/NSXSI58-Produktblatt-NSX05-04.pdf>, Abruf: 04.04.2006. Internet
- [325] BAUMANN, Werner; SCHREIBER, Erik; KRAUSE, Guido; PODSSUN, Angela; HOMMA, Susanne; KEUER, Andreas; SCHROTT, René; FREUND, Ingo; LEHMANN, Mirko: Living Neuronal Networks on Multiparametric Neurosensor Microchips. In: *11. Symposium Maritime Elektrotechnik, Elektronik und Informationstechnik, Arbeitskreis Mess- und Informationstechnik*, 2004, S. 67–70
- [326] HENSEL ELEKTRONIK GMBH: *LAURA - Die PCI - Karte mit USB 2.0 - Interface zur Signalverarbeitung*. Version: April 2005. <http://hensel-elektronik.de/laura.htm>, Abruf: 30.06.2006. Internet
- [327] MEMEC DESIGN: *Virtex-II[™] V2MB1000 Development Board User's Guide*, 2002. http://www.files.em.avnet.com/files/177/v2mb_user_guide_3_0.pdf
- [328] TEXAS INSTRUMENTS: *TMS320C6713 DSP Starter Kit (DSK)*. Version: Juni 2004. <http://focus.ti.com/docs/toolsw/folders/print/tmdsdsk6713.html>, Abruf: 17.07.2006. Internet. – TMS320C6713 DSP Starter Kit TMDSDSK6713–OE Multi Releases 701895E Rev. B
- [329] SPECTRUM DIGITAL: *TMS320C6713 DSK Technical Reference*, 2003. http://c6000.spectrumdigital.com/dsk6713/V1/docs/dsk6713_TechRef.pdf
- [330] BRAINTECHNOLOGY: *USB High Speed Interface V2.5 mit I²C EEPROM*. Version: Mai 2003. http://www.braintechnology.de/braintechnology/usb_fastinterface25.html, Abruf: 26.06.2006. Internet
- [331] TAUTORAT, Carsten: *FPGA-DSP-Interface*. 2005. – Universität Rostock
- [332] KIRCHNER, Klaus-Peter: *FPGA für die Spike-Detektion vom BISC 02*. Universität Rostock, 2006
- [333] CYPRESS: *EZ-USB FX2LP[™] USB Microcontroller*, 2006. http://download.cypress.com.edgesuite.net/design_resources/datasheets/contents/cy7c68013a_8.pdf
- [334] KEUER, Andreas: *Real Time Spike Detection Of Biological Neural Signals Using A FPGA Module*, University of Reading, Masterarbeit, 2004
- [335] KIRCHNER, Klaus-Peter: *Memories in Spike Detection*. Universität Rostock, 2006

- [336] KIRCHNER, Klaus-Peter: *Spike data in FIFO*. Universität Rostock, 2006
- [337] GOSSNER, Kai: *USB2.DLL Version 1.7.8 An easy programming interface for the Cypress Cy7c68013(A) USB 2.0 controller*. Braintechnology, Januar 2007
- [338] BAUSCH, Gerold: *Dokumentation zum Teilprojekt Neuronaler Silizium-Hybrid-Netzwerksensor zum Monitoring neuronaler Aktivitätszustände und Substanzwirkungen*. Universität Rostock, August 2006
- [339] PLEXON INC.: *How to Read PLX and DDT Files*. Version: 2006. <http://plexoninc.com/support/softwaredevkit.html>, Abruf: 07.04.2007. Internet
- [340] BUDSZUHN, Frank: *Visual C++ Windows-Programmierung mit den MFC*. Addison-Wesley, 2002. – ISBN 3827318696
- [341] BRUCE, Lori M.; LARSEN, Sara E.: Wavelet Denoising of Patch Clamp Signals for Improved Histogram Analysis. In: *International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society* Bd. 1, 2000, S. 310–313
- [342] OWEISS, Karim G.; ANDERSON, David J.: Noise reduction in multichannel neural recordings using a new array wavelet denoising algorithm. In: *Journal of Neuroscience Methods* 38-40 (2001), S. 1687–1693
- [343] QUIROGA, R. Q.; GARCIA, H.: Single-trial event-related potentials with wavelet denoising. In: *Clinical Neurophysiology* 114 (2003), S. 376–390
- [344] FOLKERS, Andre; MOSCH, Florian; MALINA, Thomas; G. HOFMANN, Ulrich: Realtime bioelectrical data acquisition and processing from 128 channels utilizing the wavelet-transformation. In: *Neurocomputing* 52-54 (2003), S. 247–254
- [345] DONOHO, David L.; AND, Iain M. J.: Adapting to Unknown Smoothness via Wavelet Shrinkage. In: *Wavelets and Application Workshop*. Luminy, France, 1991
- [346] TASWELL, Carl: The What, How, and Why of Wavelet Shrinkage Denoising. In: *IEEE Computing in Science & Engineering* 2 (2000), Mai, Juni, Nr. 3, 12–19. <http://doi.ieeecomputersociety.org/10.1109/5992.841791>
- [347] DONOHO, D.; JOHNSTONE, I.: Ideal Spatial Adaptation by Wavelet Shrinkage. In: *Biometrika* 81 (1994), 425–455. citeseer.ifi.unizh.ch/donoho93ideal.html
- [348] DONOHO, D. L.; JOHNSTONE, I. M.; KERKYACHARIAN, G.; PICARD, D.: Wavelet Shrinkage: Asymptopia? In: *Journal of the Royal Statistical Society B* 57 (1995), Nr. 2, 301–337. citeseer.ist.psu.edu/donoho95wavelet.html
- [349] DONOHO, David L.: De-Noising By Soft-Tresholding. In: *IEEE Transactions on Information Theory* 41 (1995), Nr. 3, 613–627. citeseer.ist.psu.edu/article/donoho94denoising.html
- [350] SCHMÜCK, Danilo: *Statistische Untersuchung von spikenden Neuronen*. 2003. – Graduiertenkolleg „Integrierte fluidische Sensor-Aktor-Systeme“, Universität Rostock

- [351] KEUER, Andreas; SCHROTT, René; TAUBE, Jan; SCHMÜCK, Danilo; BEIKIRCH, Helmut; BAUMANN, Werner: FPGA based Real-Time Detection of Spikes within Neural Signals. In: *IEEE Sensor Array and Multichannel Signal Processing Workshop*. Sitges, Spain, 2004. – ISBN 0780385462. – Proceedings-CD
- [352] DAUBECHIES, Ingrid; SWELDENS, Wim: *Factoring Wavelet Transforms into Lifting Steps*. citeseer.ist.psu.edu/article/daubechies96factoring.html. Version: 1996. – Preprint
- [353] BAUSCH, Gerold: *Untersuchung alternativer Algorithmen zur Klassifizierung neuronaler Aktionspotenziale*. 2006. – Manuskript zur Dissertation
- [354] CELOXICA LIMITED: *RC1000 Hardware Reference Manual Version 2.3*, 2001
- [355] CELOXICA LIMITED: *RC1000 Software Reference Manual Version 1.3*, 2001
- [356] SCHROTT, René; KEUER, Andreas; TAUBE, Jan; SCHMÜCK, Danilo; BEIKIRCH, Helmut; BAUMANN, Werner; SCHREIBER, Erik: Real-time Data Analysis of Actionpotentials. In: *IEEE International Conference on Computational Intelligence for Measurement Systems and Applications*. Boston, USA, 2004. – ISBN 0780383427, S. 26–29
- [357] GORARD, Stephen: Revisiting a 90-year-old debate: the advantages of the mean deviation. In: *British Journal of Educational Studies* 53 (2005), Nr. 4, S. 417–430
- [358] RIPLEY, Brian D.: *Robust Statistics* / University of Oxford, Department of Statistics. 2004. – Forschungsbericht
- [359] SCHROTT, René; KEUER, Andreas; TAUBE, Jan; SCHMÜCK, Danilo; BEIKIRCH, Helmut; BAUMANN, Werner: Echtzeit-Analyse von Aktionspotentialen. In: *Heiligenstädter Kolloquium „Technische Systeme für Biotechnologie und Umwelt“*, 2004, S. 173–174
- [360] SCHROTT, René; KEUER, Andreas; TAUBE, Jan; SCHMÜCK, Danilo; BEIKIRCH, Helmut; BAUMANN, Werner; SCHREIBER, Erik: Methoden der digitalen Signalverarbeitung zur Aktionspotentialerkennung mit einer modularen DSP- und FPGA Hardwareplattform. In: *11. Symposium Maritime Elektrotechnik, Elektronik und Informationstechnik, Arbeitskreis Mess- und Informationstechnik*, 2004, S. 63–66
- [361] SCHROTT, René; BAUSCH, Gerold; KIRCHNER, Klaus-Peter; TAUTORAT, Carsten; BEIKIRCH, Helmut; BAUMANN, Werner: Embedded Real-Time Neural Data Acquisition and Processing. In: *Embedded World Conference*, Francis Verlag, 2006. – ISBN 3772301436, S. 489–492
- [362] QUIRK, Michael C.; WILSON, Matthew A.: Interaction between spike waveform classification and temporal sequence detection. In: *Journal of Neuroscience Methods* 94 (1999), Nr. 1, S. 41–52
- [363] SCHMÜCK, Danilo: *Sensorstrukturen und Signalverarbeitung neuronaler Sensorik*. 2007. – Manuskript zur Dissertation

- [364] SCHMÜCK, Danilo; BAUSCH, Gerold; BEIKIRCH, Helmut; BAUMANN, Werner: Comparison of fast algorithms for online spike sorting and its implementation in hardware. In: *Embedded World Conference*, WEKA Fachmedien GmbH, 2008. – ISBN 978-3-7723-3961-5
- [365] ZHANG, Pu-Ming; WU, Jin-Yong; ZHOU, Yi; LIANG, Pei-Ji; YUAN, Jing-Qi: Spike sorting based on automatic template reconstruction with a partial solution to the overlapping problem. In: *Journal of Neuroscience Methods* 135 (2004), Nr. 1-2, S. 55–65
- [366] VARGAS-IRWIN, Carlos; DONOGHUE, John P.: Automated Spike Sorting using Density Grid Contour Clustering and Subtractive Waveform Decomposition. In: *Journal of Neuroscience Methods* 164 (2007), Nr. 1, S. 1–18. – Erscheint in: *Journal of Neuroscience Methods*
- [367] HORN, Charles C.; FRIEDMAN, Mark I.: Detection of single unit activity from the rat vagus using cluster analysis of principal components. In: *Journal of Neuroscience Methods* 122 (2003), Nr. 2, S. 141–147
- [368] TEXAS INSTRUMENTS: *TMS320VC33 University DSK*. Version: Juni 2003. <http://focus.ti.com/docs/toolsw/folders/print/tmdsdsk33.html#orderingoptions>, Abruf: 30.11.2007. Internet. – TMS320VC33 University DSP Starter KitTMDSDSK33–OE 701388E Rev. B
- [369] BEIKIRCH, Helmut; SCHROTT, René; KEUER, Andreas; BAUSCH, Gerold; BAUMANN, Werner; SCHREIBER, Erik; TAUTORAT, Carsten; FREUND, Ingo; LEHMANN, Mirko: Neuronales Sensorsystem zur Erfassung und Analyse von Aktionspotentialen. In: GERLACH, Gerald (Hrsg.); KADEN, Heiner (Hrsg.): *7. Dresdner Sensor-Symposium - Neue Herausforderungen und Anwendungen in der Sensortechnik* Bd. 24. Dresden, Deutschland: TUDpress, 2005 (Dresdner Beiträge zur Sensorik). – ISBN 3938863293, S. 161–164
- [370] SCHROTT, René; KEUER, Andreas; TAUBE, Jan; SCHMÜCK, Danilo; BEIKIRCH, Helmut; BAUMANN, Werner; SCHREIBER, Erik: FPGA and DSP-Based Online Spike Detection and Classification. In: *International MEA Meeting NMI Reutlingen*, BIOPRO Baden-Württemberg, 2004, 75
- [371] THE MATHWORKS: *MATLAB[®] Compiler 4 User's Guide*, 2007. http://www.mathworks.com/access/helpdesk/help/pdf_doc/compiler/compiler.pdf
- [372] PHAN, Jack: *Matlab[®] C/C++ Book*. Third Edition. LePhan Publishing, 2004. – ISBN 0-9725794-3-5
- [373] BAUSCH, Gerold: *Klassifizierung von biologischen neuronalen Signalen mithilfe der Wavelet-Transformation*, HTWK Leipzig, Masterarbeit, 2004
- [374] VALENS, C.: A Really Friendly Guide to Wavelets / University of Oxford, Pattern Analysis Research Group. Version: 1999. <http://www.robots.ox.ac.uk/~parg/mlrg/papers/arfgtw.pdf>. 1999. – Forschungsbericht

- [375] BLATT, Marcelo; WISEMAN, Shai; DOMANY, Eytan: Super-paramagnetic clustering of data. In: *Physical Review Letters* 76 (1996), 3251–3254. <http://ctwc.weizmann.ac.il/spc.html>
- [376] BLATT, Marcelo; WISEMAN, Shai; DOMMANY, Eytan: Data clustering using a modal granular magnet. In: *Neural Computation* 9 (1997), 1805–1849. <http://ctwc.weizmann.ac.il/spc.html>
- [377] WEIZMANN INSTITUTE OF SCIENCE: *The Super Paramagnetic Clustering Algorithm*. <http://ctwc.weizmann.ac.il/spc.html>, Abruf: 13.07.2007. Internet
- [378] BAUSCH, Gerold; SCHROTT, René; TAUTORAT, Carsten; KIRCHNER, Klaus-Peter; BEIKIRCH, Helmut; BAUMANN, Werner: Echtzeitauswertung neuronaler Sensordaten mit künstlichen neuronalen Netzen. In: *Leipzig Research Festival for Life Sciences 2007*, 2007. – ISBN 3981076028
- [379] TRÄNKNER, Monty: *Merkmalsextraktion, Clusterung und Klassifizierung von Zell-Netzwerk-Signalen*, Universität Rostock, Diplomarbeit, 2005
- [380] MILLIGAN, Glenn W.; COOPER, Martha C.: An Examination of Procedures for Determining the Number of Clusters in a Data Set. In: *Psychometrik* 50 (1985), Nr. 2, S. 159–179
- [381] CALINSKI, T.; HARABASZ, J.: A dendrite method for cluster analysis. In: *Communications in Statistics - Theory and Methods* 3 (1974), Nr. 1, S. 1–27
- [382] THOMS, Sophia: *Unabhängigkeitsanalyse von Zellnetzwerk-Signalen*, Universität Rostock, Diplomarbeit, 2006
- [383] SMITH, Leslie S.: Generating noisy spike trains for testing spike detection and sorting algorithms. In: *International MEA Meeting NMI Reutlingen*, BIOPRO Baden-Württemberg, 2006, 79–80
- [384] SMITH, Leslie S.: Testing spike detection and sorting algorithms using synthesized noisy spike trains. In: *International ICSC Symposium on Cognitive Neuro Science, CNS*, 2006
- [385] TOURETZKY, David S.; ALBERT, Mark V.; DAW, Nathaniel D.; LADSARIYA, Alok; BONAKDARPOUR, Mahtiyar: *HHSim: Graphical Hodgkin-Huxley Simulator*. Version: 2008. <http://www.cs.cmu.edu/~dst/HHsim/>, Abruf: 03.06.2008. Internet
- [386] NAUNDORF, Björn; WOLF, Fred; VOLGUSHEV, Maxim: Unique features of action potential initiation in cortical neurons. In: *Nature* 440 (2006), S. 1060–1063
- [387] SMITH, Leslie S.; MTETWA, Nhamoinesu: *Manual for the Noisy Spike Generator MATLAB Software: version 1.1, released 16 June 2006*. Department of Computing Science and Mathematics, University of Stirling, 2006

- [388] HAFIZOVIC, S.; HEER, F.; UGNIWENKO, T.; FREY, U.; BLAU, A.; ZIEGLER, C.; HIERLEMANN, A.: A CMOS-based microelectrode array for interaction with neuronal cultures. In: *Journal of Neuroscience Methods* 164 (2007), S. 93–106
- [389] HEER, F.; HAFIZOVIC, S.; UGNIWENKO, T.; FREY, U.; FRANKS, W.; PERRIARD, E.; PERRIARD, J. C.; BLAU, A.; ZIEGLER, C.; HIERLEMANN, A.: Single-chip microelectronic system to interface with living cells. In: *Biosensors and Bioelectronics* 22 (2007), S. 2546–2553
- [390] JOHNSTONE, Iain M.; SILVERMAN, Bernard W.: Wavelet Threshold Estimators for Data With Correlated Noise. In: *Journal of the Royal Statistical Society B* 59 (1997), 319–351. citeseer.ist.psu.edu/article/johnstone94wavelet.html
- [391] THE MATHWORKS: *Wavelet Toolbox: Dealing with Border Distortions*. Version: 2008. <http://www.mathworks.com/access/helpdesk/help/toolbox/wavelet/index.html>, Abruf: 18.08.2008. Internet
- [392] JAWERTH, Björn; SWELDENS, Wim: An Overview of Wavelet based Multiresolution Analysis. In: *SIAM Review* 36 (1994), S. 377–412
- [393] TASWELL, Carl; MCGILL, Kevin C.: Wavelet Transform Algorithms for Finite-Duration Discrete-Time Signals. In: *Association for Computing Machinery – Transactions on Mathematical Software* 20 (1994), Nr. 3, 398–412. <http://doi.acm.org/10.1145/192115.192156>
- [394] LÜKE, Hans D.: *Korrelationssignale*. Springer-Verlag, 1992. – ISBN 3540545794. – Korrelationsfolgen, Korrelationsarrays in Nachrichten- und Informationstechnik, Meßtechnik und Optik
- [395] KIENCKE, Uwe; EGER, Ralf: *Messtechnik - Systemtheorie für Elektrotechniker*. 6. Auflage. Springer, 2005. – ISBN 3-540-24310-0
- [396] *Kapitel Correlation and convolution*. In: IFEACHOR, Emmanuel C.; JERVIS, Barrie W.: *Digital Signal Processing - A Practical Approach*. Second Edition. Addison - Wesley, 2002. – ISBN 0201-59619-9, S. 260–264
- [397] COHEN, Arnon; LANDSBERG, Dorota: Adaptive Real-Time Wavelet Detection. In: *IEEE Transactions on Biomedical Engineering* 30 (1983), Nr. 6, S. 332–340
- [398] SCHMIDT, E. M.: Unit Activity From Peripheral Nerve Bundles Utilizing Correlation Techniques. In: *Medical and Biological Engineering and Computing* 9 (1971), S. 665–674
- [399] WÖRGÖTTER, Florentin; DAUNICHT, Wolfgang J.; ECKMILLER, Rolf: An on-line spike form discriminator for extracellular recordings based on an analog correlation technique. In: *Journal of Neuroscience Methods* 17 (1986), S. 141–151
- [400] GERSTEIN, George L.: Cross-correlation measures of unresolved multi-neuron recordings. In: *Journal of Neuroscience Methods* 100 (2000), S. 41–51

- [401] BAUSCH, Gerold; SCHROTT, René; KEUER, Andreas; BAUMANN, Werner; BEIKIRCH, Helmut; TAUTORAT, Carsten: Acquisition of biological neural network signals under real-time conditions. In: *4th International Symposium on Automatic Control*. Wismar, Germany, 2005. – ISBN 3910102794
- [402] SCHMÜCK, Danilo; KEUER, Andreas; SCHROTT, René; BEIKIRCH, Helmut: Spikedetection und Spikesorting - Methoden und Lösungsansätze. In: *11. Symposium Maritime Elektrotechnik, Elektronik und Informationstechnik, Arbeitskreis Mess- und Informationstechnik*, 2004, S. 39–42
- [403] BEIKIRCH, Helmut; SCHROTT, René; KEUER, Andreas; BAUSCH, Gerold; BAUMANN, Werner; SCHREIBER, Erik; TAUTORAT, Carsten; FREUND, Ingo; LEHMANN, Mirko: Erfassung und Analyse von Aktionspotentialen eines neuronalen Mikrosensors unter Echtzeitbedingungen. In: *Mirkosystemtechnik Kongress 2005*. Freiburg : VDE Verlag, 2005. – ISBN 3800729261, S. 439–442
- [404] CRAMER, Erhard; KRAMPS, Udo: *Grundlagen der Wahrscheinlichkeitsrechnung und Statistik*. Springer Verlag, 2007. – ISBN 978-3-540-36342-2
- [405] DIEDRICH, André; CHAROENSUK, Warakorn; BRYCHTA, Robert J.; ERTL, Andrew C.; SHIAVI, Richard: Analysis of Raw Microneurographic Recordings Based on Wavelet Denoising Technique and Classification Algorithm: Wavelet Analysis in Microneurography. In: *IEEE Transactions On Biomedical Engineering* 50 (2003), Nr. 1, S. 41–50
- [406] BRYCHTA, Robert J.; TUNTRAKOOL, Sunti; APPALSAMY, Martin; KELLER, Nancy R.; ROBERTSON, David; SHIAVI, Richard G.; DIEDRICH, André: Wavelet Methods for Spike Detection in Mouse Renal Sympathetic Nerve Activity. In: *IEEE Transactions on Biomedical Engineering* 54 (2007), Nr. 1, S. 82–93
- [407] WILTSCHKO, Alexander B.; GAGE, Gregory J.; BERKE, Joshua D.: *Wavelet filtering before spike detection preserves waveform shape and enhances single-unit discrimination*. – Journal of Neuroscience Methods (in press)
- [408] KIRCHNER, Klaus-Peter: *Probleme bei der Rauschunterdrückung mit Wavelet-Ansatz*. Email, Juni 2008. – Universität Rostock
- [409] DOW CORNING: *Dow Corning® 96-083 Silicone Adhesive Kit*. <http://www.dowcorning.com/applications/search/products/details.aspx?prod=01247875&type=PROD>, Abruf: 07.11.2007. Internet
- [410] SCHREIBER, Erik: *Chipverkapselung und Autoklaviertest*. 2005. – Persönliche Kommunikation, Laborbuch ESO
- [411] BAUMANN, Werner; EHRET, Ralf; THEDINGA, Elke; KOB, Axel; KEUER, Andreas; PODSSUN, Sabine Drechslerand A.; KÖSTER, Phillip; TAUTORAT, Carsten; SCHROTT, René; BEIKIRCH, Helmut; FREUND, Ingo; LEHMANN, Mirko: Cell monitoring systems with multiparametric CMOS biosensorchips. In: *International MEA Meeting NMI Reutlingen, BIOPRO Baden-Württemberg*, 2006. – ISBN 3938345020, 161–162

- [412] SCHROTT, René; TAUTORAT, Carsten; KIRCHNER, Klaus-Peter; KOESTER, Philipp J.; BAUSCH, Gerold; BAUMANN, Werner; FREUND, Ingo; BEIKIRCH, Helmut: Hardwareentwurf für ein Messsystem zur Untersuchung elektrisch aktiver Zellen. In: *12. Symposium Maritime Elektrotechnik, Elektronik und Informationstechnik*, 2007, S. 93–97
- [413] SCHROTT, René; TAUTORAT, Carsten; PODSSUN, Angela; KOESTER, Philipp J.; KIRCHNER, Klaus-Peter; BAUSCH, Gerold; BEIKIRCH, Helmut; BAUMANN, Werner; FREUND, Ingo: CMOS Sensorsystem zur Untersuchung elektrisch aktiver Zellen. In: *Mikrosystemtechnik-Kongress Dresden*, VDE Verlag GmbH, 2007. – ISBN 978–3800730612, S. 445–447
- [414] BANACH, K.; HALBACH, M. D.; HU, P.; HESCHELER, J.; EGERT, U.: Development of electrical activity in cardiac myocyte aggregates derived from mouse embryonic stem cells. In: *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology* 284 (2003), S. H2114–H2123
- [415] HEER, Flavio: *CMOS-based Microelectrode Array for Communication with Electrogenic Cells*, Swiss Federal Institute of Technology, Physical Electronics Laboratory, ETH Zürich, Diss., 2005
- [416] HAFIZOVIC, Sadik: *Neural Interface and Atomic-force Microscope in CMOS technology*, ETH Zürich Swiss Federal Institute of Technology, Physical Electronics Laboratory, Diss., 2006
- [417] WILLMING, D. A.; WHEELER, Bruce C.: A real-time multichannel DSP-based neural signal analysis system. In: *International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society* Bd. 3. New Orleans, LA, USA, 1988, S. 1169–1170
- [418] NOVAK, J. L.; WHEELER, B. C.: A high-speed multichannel neural data acquisition system for IBM PC compatibles. In: *Journal of Neuroscience Methods* 26 (1989), Nr. 3, S. 239–47
- [419] ALDRIDGE, J. W.; MALDEN, Jonathan L.; GILMAN, Sid: Enhancing high-speed digitization of single-unit neuronal activity on a microcomputer using a hybride software-hardware technique. In: *Journal of Neuroscience Methods* 28 (1989), Nr. 3, S. 205–208
- [420] LI, Jen-Yu; JANG, Jin-Kae; KUO, Te-Son; JAW, Fu-Shan: Evaluation of a PC-Based Data Acquisition System for Long-Term Recording of Action Potentials with Minimal Dedicated Circuits. In: *Biomedical Engineering - Applications, Basis & Communications* 17 (2005), Nr. 5, S. 263–266
- [421] HARRISON, Reid; WATKINS, Paul; KIER, Ryan; LOVEJOY, Robert; BLACK, Daniel; NORMANN, Richard; SOLZBACHER, Florian: A Low-Power Integrated Circuit for a Wireless 100-Electrode Neural Recording System. In: *IEEE International Solid State Circuits Conference*, 2006

- [422] NARASIMHAN, Seetharam; TABIB-AZAR, Massood; CHIEL, Hillel J.; BHUNIA, Swarup: Neural Data Compression with Wavelet Transform: A Vocabulary Based Approach. In: *International IEEE EMBS Conference on Neural Engineering*, 2007, S. 666–669
- [423] YEKUTIELI, Ziv; PERELMAN, Yevgeny; GINOSAR, Ran; MAROM, Shimon: A Multichannel Recording Frontend for MEA. In: *International MEA Meeting NMI Reutlingen, BIOPRO Baden-Württemberg*, 2006. – ISBN 3938345020, 214–215
- [424] ELENA, M. M.; QUERO, J. M.; BORREGO, I.: An Optimal Technique for ECG Noise Reduction in Real Time Applications. In: *Computers in Cardiology* 33 (2006), 225–228. <http://cinc.mit.edu/archives/2006/>
- [425] BORGHI, T.; GUSMEROLI, R.; SPINELLI, A.S.; BARANAUSKAS, G.: A simple method for efficient spike detection in multiunit recordings. In: *Journal of Neuroscience Methods* 163 (2007), S. 176–180
- [426] CORDES, Ben; DY, Jennifer; LEESER, Miriam; GOEBEL, James: Enabling a Real-Time Solution for Neuron Detection with Reconfigurable Hardware. In: *International Workshop on Rapid System Prototyping (RSP'05)*, 2005
- [427] BACHOFEN, Daniel: *FPGA Wavelet Transformation für Bildübertragung*, FHS Hochschule für Technik, Wirtschaft und Soziale Arbeit St.Gallen Fachbereich Elektrotechnik, Diplomarbeit, 2001
- [428] MASON, A.; LI, J.; THOMSON, K.; SUHAIL, Y.; OWEISS, K.: Design Optimization of Integer Lifting DWT Circuitry for Implantable Neuroprosthetics. In: *IEEE EMBS Special Topic Conference on Microtechnology in Medicine and Biology*, 2005
- [429] FEE, Michale S.; MITRA, Partha P.; KLEINFELD, David: Variability of Extracellular Spike Waveforms of Cortical Neurons. In: *Journal of Neurophysiology* 76 (1996), S. 3823–3833
- [430] SPENCE, A.J.; HOY, R.R.; ISAACSON, M.S.: A micromachined silicon multielectrode for multiunit recording. In: *Journal of Neuroscience Methods* 126 (2003), S. 119–126
- [431] MALLET, Yvette; COOMANS, Danny; KAUTSKY, Jerry; DE VEL, Olivier: Classification Using Adaptive Wavelets for Feature Extraction. In: *IEEE Transactions On Pattern Analysis And Machine Intelligence* 19 (1997), Nr. 10, S. 1058–1066
- [432] CAO, Shiyan: *Spike Train Characterization and Decoding for Neural Prosthetic Devices*, California Institute of Technology, PhD thesis, 2003
- [433] HONG, J. C.; KIM, Y.Y.: Determination of the Optimal Gabor Wavelet Shape for the Best Time-Frequency Localization Using the Entropy Concept. In: *Experimental Mechanics* 44 (2004), Nr. 4, S. 387–395
- [434] KAREL, J.M.H.; PEETERS, R.L.M.; WESTRA, R.L.; MOERMANS, K.M.S.; HADDAD, S.A.P.; SERDIJN, W.A.: Optimal discrete wavelet design for cardiac signal processing. In: *IEEE Conference Engineering in Medicine and Biology*, 2005

- [435] ALMAGRO, S.; ELENA, M. M.; BASTIAANS, M. J.; QUERO, J.M.: A New Mother Wavelet for Fetal Electrocardiography to Achieve Optimal Denoising and Compressing Results. In: *Computers in Cardiology* 33 (2006), S. 157–160
- [436] SINGH, Brij N.; TIWARI, Arvind K.: Optimal selection of wavelet basis function applied to ECG signal denoising. In: *Digital Signal Processing* 16 (2006), S. 275–287
- [437] NIELSEN, Mogens; KAMAVUAKO, Ernest N.; ANDERSEN, Michael M.; LUCAS, Marie-Francoise; FARINA, Dario: Optimal wavelets for biomedical signal compression. In: *Med Bio Eng Comput* 44 (2006), S. 561–568
- [438] FARINA, Dario; DO NASCIMENTO, Omar F.; LUCAS, Marie-Francoise; DONCARLI, Christian: Optimization of wavelets for classification of movement-related cortical potentials generated by variation of force-related parameters. In: *Journal of Neuroscience Methods* 162 (2007), S. 357–363
- [439] A. BERGER, Pedro de; O. NASCIMENTO, Francisco A.; CARMO, Jake C.; ROCHA, Adson F.: Compression of EMG signals with wavelet transform and artificial neural networks. In: *Institute of Physics Publishing, Physiological Measurement* 27 (2006), S. 457–465
- [440] ERDOL, Nurgun; BAO, Feng: Use of Shift Variance of the Wavelet Transform for Signal Detection. In: *IEEE Digital Signal Processing Workshop*, 1994
- [441] BRADLEY, Andrew P.: Shift-invariance in the Discrete Wavelet Transform. In: SUN, C. (Hrsg.); TALBOT, H. (Hrsg.); OURSELIN, S. (Hrsg.); ADRIAANSEN, T. (Hrsg.): *VIIth Digital Image Computing: Techniques and Applications*, 2003
- [442] FRALEY, C.; RAFTERY, A. E.: How Many Clusters? Which Clustering Method? Answers Via Model-Based Cluster Analysis / Department of Statistics University of Washington. 1998 (329). – Forschungsbericht
- [443] TIBSHIRANI, R.; WALTHER, G.; HASTIE, T.: Estimating the number of clusters in a dataset via the gap statistic / Dept. of Statistics, Stanford University. Version:2000. citeseer.ist.psu.edu/tibshirani00estimating.html. 2000 (208). – Forschungsbericht
- [444] HARRIS, Kenneth D.; HIRASE, Hajime; LEINEKUGEL, Xavier; HENZE, Darrell A.; ; BUZSÁKI, György: Temporal Interaction between Single Spikes and Complex Spike Bursts in Hippocampal Pyramidal Cells. In: *Neuron* 32 (2001), S. 141–149
- [445] SCHMITZER-TORBERT, N.; JACKSON, J.; HENZE, D.; HARRIS, K.; REDISH, A. D.: Quantitative measures of cluster quality for use in extracellular recordings. In: *Neuroscience* 131 (2005), Nr. 1, S. 1–11
- [446] JOSHUA, Mati; ELIAS, Shlomo; LEVINE, Odeya; BERGMAN, Hagai: Quantifying the isolation quality of extracellularly recorded action potentials. In: *Journal of Neuroscience Methods* 163 (2007), S. 267–282

- [447] SIMON, William: The Real-Time Sorting of Neuro-Electric Action Potentials In Multiple Unit Studies. In: *Electroencephalography and Clinical Neurophysiology* 18 (1965), S. 192–195
- [448] MISHELEVICH, David J.: On-Line Real-Time Digital Computer Separation of Extracellular Neuroelectric Signals. In: *IEEE Transactions on Biomedical Engineering* 17 (1970), Nr. 2, S. 147–150
- [449] DILL, John C.; LOCKEMANN, Peter C.; NAKA, Ken-Ichi: An Attempt to Analyze Multi-Unit Recordings. In: *Electroencephalography and Clinical Neurophysiology* 28 (1970), S. 79–82
- [450] KIM, Kyung H.; KIM, Sung J.: Method for unsupervised classification of multiunit neural signal recording under low signal-to-noise ratio. In: *IEEE Transactions on Biomedical Engineering* 40 (2003), Nr. 4, S. 421–431
- [451] NENADIC, Zoran: Control Algorithm for Movable Neuro-Probes / Caltech Center for Neuromorphic Systems Engineering. Version: 2006. <http://www.cnse.caltech.edu/Research/reports/nenadic-full.html>. 2006. – Forschungsbericht
- [452] BOVE, M.; MARTINOIA, S.; VERRESCHI, G.; GIUGLIANO, M.; GRATTAROLA, M.: Analysis of the signals generated by networks of neurons coupled to planar arrays of microtransducers in simulated experiments. In: *Biosensors and Bioelectronics* 13 (1998), Nr. 6, S. 601–612
- [453] BIONAS GMBH: *Temperature Controller TR100 User Manual*, 2005
- [454] OMEGA ENGINEERING: *CN8201 Series 1/16 DIN Temperature & Process Controllers*, 2006. <http://www.omega.com/manuals/manualpdf/M2942.pdf>
- [455] DEFOSSEZ, Marc: *FPGA Interface to the TMS320C6000 DSP Platform Using EMIF*. Xilinx, 2004. http://www.eetasia.com/ARTICLES/2004DEC/A/2004DEC10_PL_DSP_AN.PDF
- [456] XILINX: *Interfacing Xilinx FPGAs to TI DSP Platforms Using the EMIF*, 2005. <http://www.xilinx.com/bvdocs/appnotes/xapp753.pdf>
- [457] MEYERS LEXIKONVERLAG: *Begriffe und Definitionen*. Version: 2007. <http://lexikon.meyers.de>, Abruf: 09.11.2007. Internet. – Bibliographisches Institut & F. A. Brockhaus AG

Anhang A

Neurosensor BISC 02

Das prinzipielle Sensor-*Layout* des BISC 0201/0202 ist in Abbildung A.2 dargestellt. Neben den zentral angeordneten Sensoren lässt sich die zusätzlich integrierte Chip-Elektronik erkennen. Diese Elektronik umfasst das I²C-Interface zur Chip-Konfiguration, die Vorverstärker und Filter zur Signalkonditionierung sowie die Multiplexer und *Pad*-Treiber zur Signalausgabe. Sowohl passive Palladium-Elektroden als auch verschiedene FET-Sensoren befinden sich innerhalb des sensitiven Bereiches des Sensorchips. Dieser Bereich entspricht dem Innendurchmesser des Chiptroges und der ringförmigen Struktur, die im *Layout* erkennbar ist. Die Elektroden sind einmal als ein Multielektrodenarray mit 64 Elektroden und als eine einzelne Gruppe von vier Elektroden angeordnet. Die Abmessungen der Elektroden in beiden Gruppen sind identisch und in der Abbildung A.1 zusammengefasst.

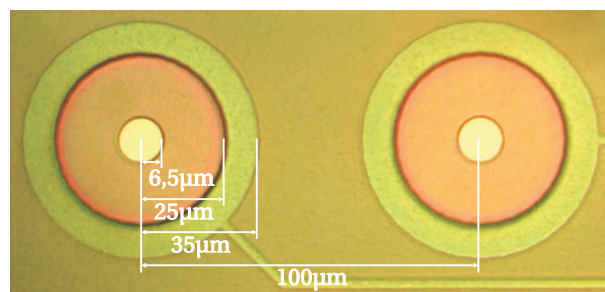


Abbildung A.1: Abmessungen der passiven Elektroden des BISC 02 nach [9]

Die FETs lassen sich in CPFET- und ISFET-Sensoren unterteilen. Die CPFETs sind in drei Gruppen, zwei mit je vier und eine mit sechs Transistoren, angeordnet. Die CPFETs einer Gruppe besitzen einen gemeinsamen *Drain*-Anschluss. Die CPFETs weisen eine variable *Gate*-Geometrie auf. Die beiden ISFETs sind separat angeordnet. Ein einzelner CPFET kann als Diode beschaltet und so der Temperaturmessung auf dem Chip dienen. Das I²C-Interface gestattet die Chipkonfiguration. Diese umfasst die MEA-Signalauskopplung, die Signalkonditionierung, die Signalausgabe sowie die Lage der Arbeitspunkte der auf dem Chip befindlichen OPV und damit das dynamische Verhalten und die Stromaufnahme des Chips. Die MEA-Sensoren können bestimmten Regionen der Zellkultur zugeordnet werden und erlauben z. B. auch eine gezielte Stimulierung [310].

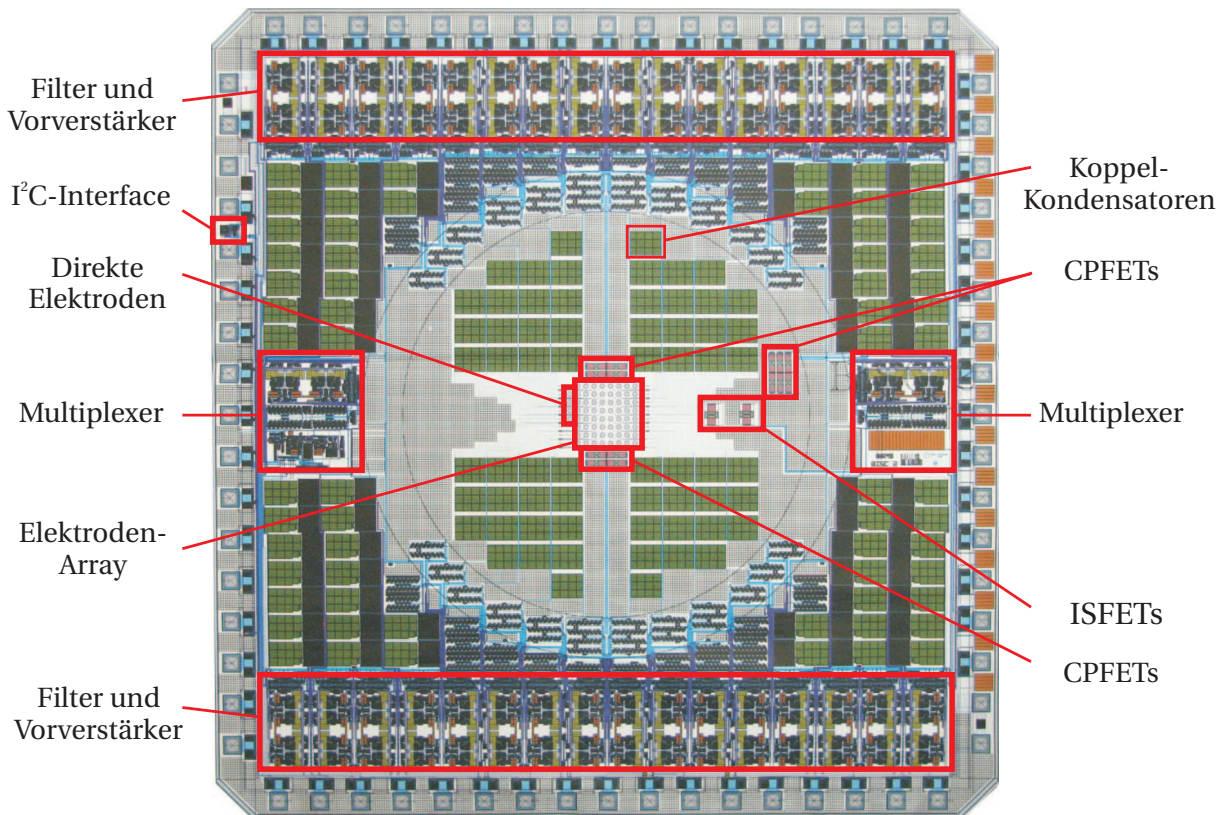


Abbildung A.2: Anordnung der wichtigsten Funktionseinheiten des Neurosensorchips

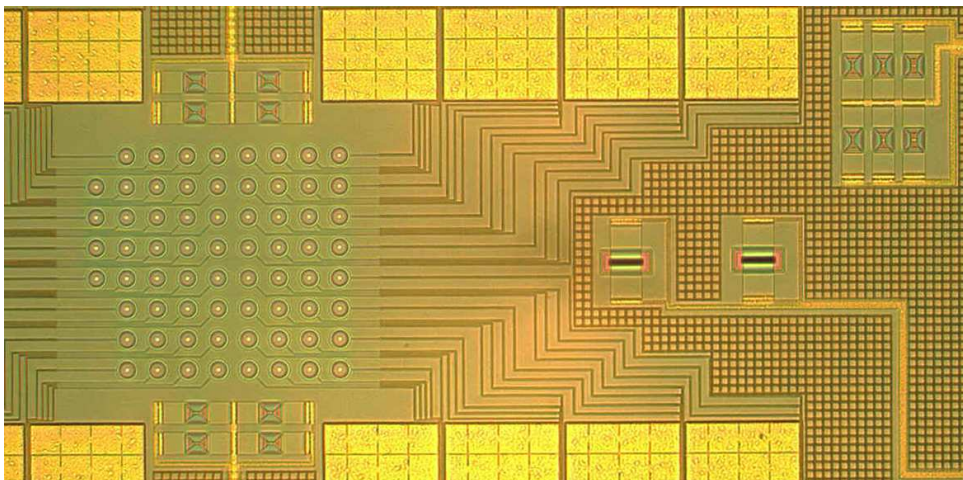


Abbildung A.3: Detailansicht der Sensorgruppe des BISC 02 nach [9]

Anhang B

Sensorumgebung

B.1 Gesamtsystem

Für erste Inbetriebnahmetests des Neurosensors BISC 0201/0202 wurde ein Nadelkartennadapter entworfen, welcher die direkte Kontaktierung der *Pads* auf dem Siliziumwafer ermöglichte. Neben der Betriebsspannung ist eine externe Pufferung der intern generierten Bandgapspannung erforderlich. Diese Stabilisierung kann mit zwei komplementären Darlington-Stufen realisiert werden. Der I²C-Bus erlaubt die gewünschte Konfiguration des Sensors. Mittels Trigger, Reset, MuxClk, Test2, Atest und Stimulus können unterschiedliche externe Signale für verschiedene Aufgaben an den Sensor in den entsprechenden Betriebsmodi angelegt werden. Die Signale der vier direkten Elektroden repräsentieren die nicht konditionierten Signale der direkten Elektroden 65-68. Mittels der Biscout-Ausgänge können die aufbereiteten Signale der verbleibenden 64 Elektroden des Sensorarrays nach dem Multiplexverfahren abgegriffen werden [310, 316].

Bustreiber sowie eine galvanische Trennung des I²C-Busses zwischen Messrechner und Neurosensor mittels Optokoppler gewährleisten die zuverlässige Konfiguration des Sensorchips. Aufbauend auf der Inbetriebnahme-*Hardware* erfolgte die Realisierung einer komplexeren Sensorplattform, siehe auch Abbildung B.1. Mit diesem NMA erfolgt die Ansteuerung des Neurosensors, die analoge Konditionierung und die Digitalisierung der MEA-Signale. *Level Shifter* gestatten die Ansteuerung der 5 V-Logik des BISC 02 durch die 3,3 V-Ausgänge des FPGA. Nach der DSV auf dem FPGA-Modul werden die Daten per USB 2.0 auf einen PC übertragen. Diesen Transfer und die I²C-Kommunikation übernimmt ein Modul von Braintechonology [330]. Während eines Experimentes muss die Zellkultur auf konstant 37 °C gehalten werden. Diese Temperaturregelung im NMA erfolgt mit dem Gerät TR100 der Firma Bionas[®] [453] sowie einem speziellen Heizaufsatz. Der externe Temperatursensor vom Typ PT100 befindet sich direkt unter dem Neurochip und gestattet so eine genaue Temperaturmessung. Die Regelung basiert auf dem PID-Regler CN8201 der Firma *Omega Engineering* [454].

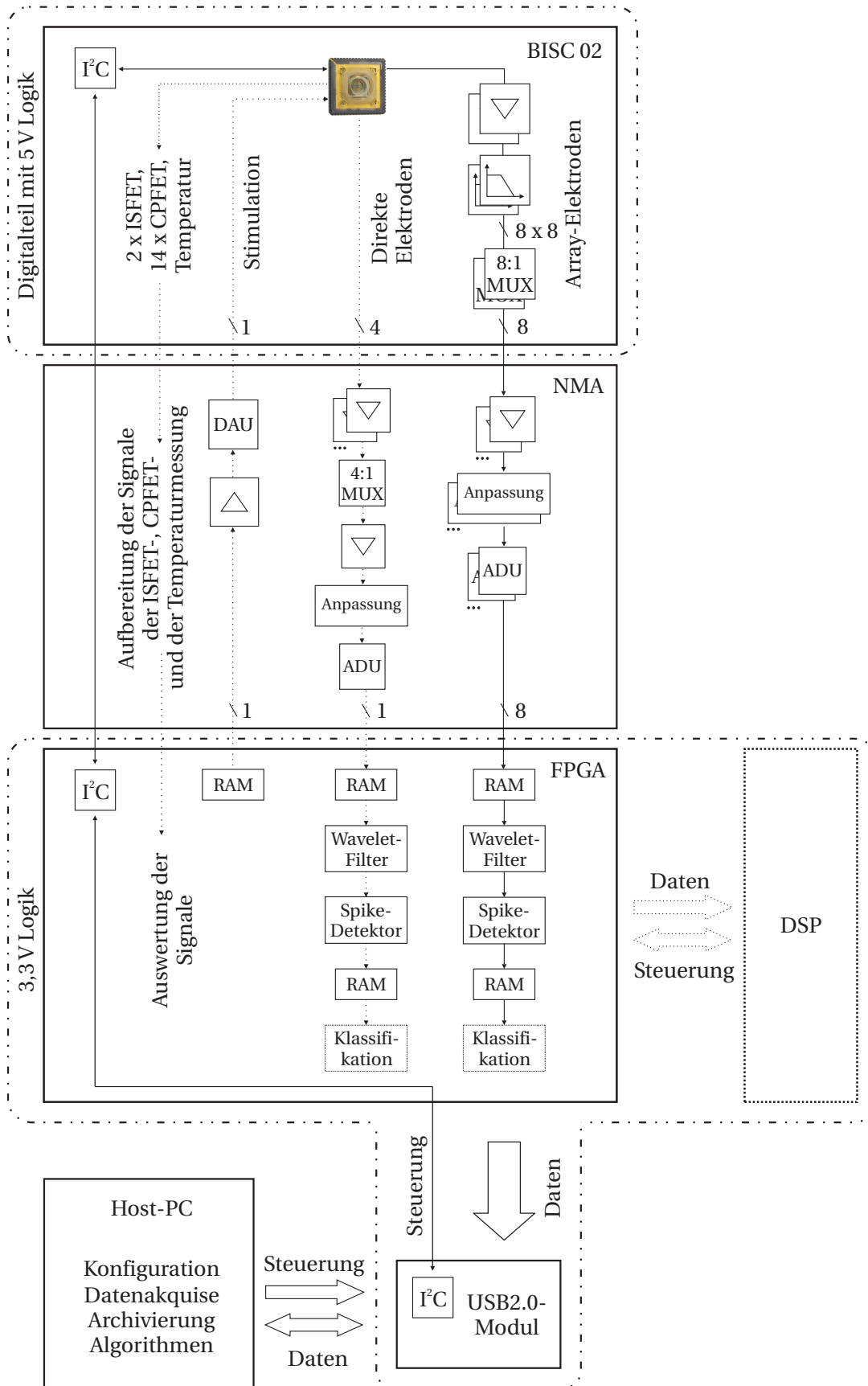


Abbildung B.1: Vereinfachte Darstellung des vollständigen Hardware-Konzeptes

B.2 FPGA und DSP Interface-Schaltung

Zusätzlich wurde die Möglichkeit geschaffen einen DSP an das FPGA-Modul anzuschließen. Das realisierte Interface kann zur experimentellen Implementation ausgewählter Algorithmen verwendet werden und gestattet einen Datenaustausch zwischen einem DSP-Evaluationboard für den TMS320C6713 von Texas Instruments [328, 329] und einer FPGA-Entwicklungsumgebung für den Virtex-II [327] nach [455, 456]. Zur Erhöhung der zur Verfügung stehenden Ein- bzw. Ausgänge wurden die LVDS (*Low-Voltage Differential Signalling*)-Pins des FPGA-Board modifiziert, wodurch diese nun als einfache Ein- bzw. Ausgabe-Pins zur Verfügung stehen. Das Interface ermöglicht sowohl einen asynchronen als auch einen synchronen Datenaustausch nach [456]. Das steuernde FPGA-Modul spricht den Neuromessadapter bzw. den DSP an. Weiter gehende Hinweise zur Nutzung dieses Interfaces können [338, 353] entnommen werden. Eine allgemeine Beschreibung der Struktur ist bereits im Abschnitt 5.2 enthalten.

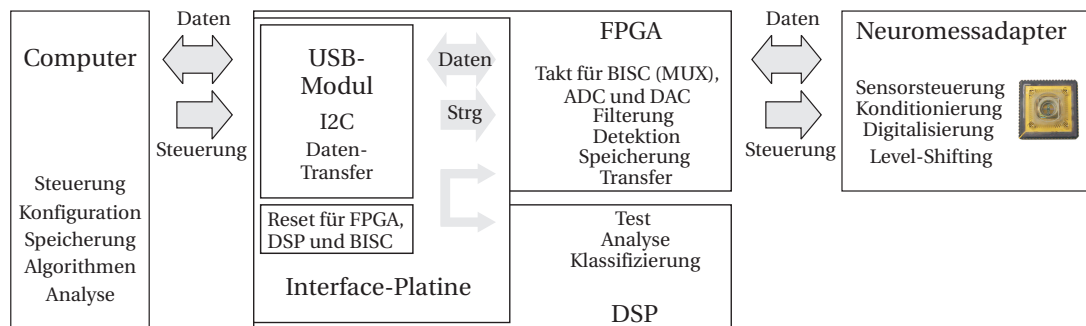


Abbildung B.2: Prinzipieller Aufbau des FPGA-DSP-Interface zur Steuerung des BISC 02 und zur Sensordatenerfassung

Selbstständigkeitserklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht verwendet und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

René Schrott,
Rostock, 05. Dezember 2008

Lebenslauf

Personalien René Schrott, Strindbergstr. 18, 18106 Rostock
Geb.: 22. Januar 1974, Zwenkau (Sachsen, D)

Schulbildung

09/1980–07/1990 Polytechnische Oberschule Markkleeberg

09/1995–07/1998 Abendgymnasium Leipzig

Berufsausbildung

09/1990–02/1994 Ausbildung zum Industrieelektroniker (Gerätetechnik),
RFT Nachrichtentechnik Leipzig, GBZ Leipzig

06/1995–03/1997 Ausbildung bzw. Umschulung zum Elektroinstallateur,
Augsburger Lehmbaugesellschaft in Leipzig

Hochschulausbildung

09/1998–04/2003 Studium der Elektrotechnik, Hochschule für Technik, Wirtschaft
und Kultur Leipzig (FH), Studienrichtung Nachrichten- und
Kommunikationstechnik: Dipl.-Ing.(FH)

09/2001–05/2002 Studium der Elektrotechnik, University of Paisley, GB: BEng(Hons)

Beruflicher Werdegang

03/1994–04/1995 Industrieelektroniker, GeBe Leipzig GmbH

03/2001–08/2001 Praktikum: EADS Deutschland GmbH, Ulm

05/2003–08/2008 Wiss. Mitarbeiter, Doktorand, Universität Rostock: Forschung an einem
Sensor zur Analyse biologischer elektrisch aktiver Zellverbände

seit 09/2008 Entwicklungsingenieur (Embedded Systems), Plath GmbH, Hamburg

Rostock, 06. Juni 2009

Thesen der Dissertation

1. Generell stellt die Zelle die kleinste selbsterhaltende biologische Einheit dar. Es ist möglich, die Reaktion von elektrisch aktiven, biologischen Zellverbände mit Multi-elektrodenarrays (MEAs) zu erfassen. Vor allem biologische, neuronale Netze erweisen sich in diesem Zusammenhang als sehr sensibel gegenüber Änderungen ihrer chemischen Umgebung. Die Reaktion dieser fehlertoleranten und spontan aktiven Netzwerke ist dabei oft substanz- und konzentrationsabhängig.
2. Neben elektrophysiologischen Messungen liefern auch metabolische Untersuchungen dieser Zellen einen Aufschluss über deren Zustand. Die parallele, nicht invasive, messtechnische Erfassung mehrerer Zellparameter verbessert das Verständnis von Prozessen auf der Zellebene.
3. An der Universität Rostock wurden bereits unterschiedliche *Cell Monitoring Systems* entwickelt, welche die zeitgleiche Messung unterschiedlicher Zellparameter gestatten. Die dabei eingesetzten Silizium-basierten Sensorchips besitzen jeweils eine planare MEA-Struktur, die mit anderen Sensoren *on-chip* kombiniert werden kann.
4. Diverse Funktionalitäten eines solchen Messsystems müssen sowohl im Bereich der Sensorik als auch bei der Datenverarbeitung und Visualisierung für eine breitere Anwendung optimiert werden. Neben einer vereinfachten Handhabung ist auch eine automatisierte Datenakquisition erforderlich, welche idealerweise um eine nicht überwachte Datenauswertung ergänzt werden sollte.
5. Im Mittelpunkt dieser Arbeit steht der jüngste CMOS-Sensorchip, der an der Universität Rostock in Kooperation mit der Micronas GmbH entwickelt wurde. Dieser Chip besitzt neben Sensoren für elektrophysiologische und metabolische Messungen auch eine integrierte Signalkonditionierung. Diese zusätzliche Integration erlaubt einen vereinfachten Messaufbau.
6. Die Inbetriebnahme und die Verifizierung dieses Neurosensors sowie der Entwurf und die Evaluierung der erforderlichen externen Sensorumgebung bilden daher einen wesentlichen Schwerpunkt dieser Dissertation. Zudem gilt es, die Sensorsignale verlustfrei zu erfassen, zu verarbeiten und zu archivieren. Es müssen deshalb auch die Ressourcen für die parallele, zeitkritische Datenverarbeitung bereitgestellt werden. Das Ziel ist die Schaffung eines möglichst kompakten Messsystems, welches einfach zu handhaben sein muss.

7. Trotz kommerzieller Anbieter ist selbst entwickelte, externe *Sensor-Hardware* zur Realisierung eines möglichst kompakten Messsystems sinnvoll. Sie gestattet die zusätzliche analoge Konditionierung und die Digitalisierung der Sensordaten.
8. Ein Multielektrodenarray liefert bereits bei moderaten Abtastraten eine beträchtliche Datenmenge. Es können deshalb Probleme bei der Verwaltung und der Auswertung der Daten entstehen. Eine geeignete Extraktion von so genannten Aktionspotentialen kann die erforderliche Bandbreite für den Datentransfer deutlich reduzieren.
9. Eine mehrstufige Signalzerlegung mittels *Wavelet*-Transformation und die anschließende Filterung (*Detrending, Denoising*) vor der Signalrekonstruktion kann das Ergebnis einer einfach zu implementierenden Schwellendetektion deutlich verbessern. Die kontinuierlich gewonnenen oder extrahierten Daten können per USB 2.0 auf einem Messrechner transferiert und gesichert werden.
10. Zur Klassifizierung von Aktionspotentialen können unterschiedlichste Merkmale, wie z. B. Amplitude, Form oder zeitliches Auftreten, genutzt werden. Aufgrund einer von Experiment zu Experiment, von MEA zu MEA und von Elektrode zu Elektrode variierenden Zell-Sensor-Kopplung existieren allerdings keine universell anwendbaren Merkmalsvektoren für die Signalzuordnung. Diese Merkmale müssen z. B. während einer Lernphase mit geeigneten, möglichst nicht überwachten Verfahren gewonnen werden.
11. Die Gewinnung von geeigneten Klassifikationsmerkmalen wird u. a. durch eine mögliche Amplitudenänderung der Aktionspotentiale um bis zu 80 % bei erhöhter Zellaktivität, graduellen Formänderungen und veränderlichen Rauscheigenschaften erschwert. Die Anwendung selbstlernender, nicht überwachter Verfahren erscheint im Vergleich zu heuristischen Methoden vorteilhafter und flexibler.
12. Umfangreiche Forschungsarbeiten haben bereits eine Reihe möglicher Klassifikationsansätze hervorgebracht. Aufgrund fehlender objektiver Standards wird ein Vergleich dieser Verfahren erschwert. Erst eine gemeinsame Datenbasis und definierte Rahmenbedingungen werden eine objektive Bewertung dieser Methoden ermöglichen. Eine Kombination bereits existierender Verfahren könnte zur Klassifikation eingesetzt werden.
13. Die Ethik wie auch gesetzliche Vorgaben erfordern einen Ersatz von Tierversuchen. Die hier vorgestellte Technologie besitzt das Potential die Zahl der Tierversuche zu reduzieren, da Substanzeffekte bereits auf Zellebene erfasst werden können. Allerdings müssen weitere, robuste Verfahren der Datenanalyse geschaffen werden, um die Sensordaten effektiv, d. h. automatisch, auszuwerten. Nur so können die Sensornanzahl erhöht und die anfallenden Datenmengen analysiert werden.

Glossar

Aktionspotential Messbare Potentialdifferenz zwischen dem Inneren einer Nervenzelle und ihrer Umgebung aufgrund von Ionenströmen durch die Poren der Zellmembran. Die Form eines Aktionspotentials einer Zelle bleibt in der Regel stabil und kann somit als Klassifikationsmerkmal genutzt werden. Oftmals wird der Begriff „Spike“ als Synonym für „Aktionspotential“ genutzt. *Seite 1*

Bionas[®] Ausgründung im Umfeld der Arbeitsgruppen um Wolf und Baumann zusammen mit der Micronas GmbH zur Vermarktung erzielter Forschungsergebnisse. *Seite 14*

Burst Unter einem *Burst* versteht das vermehrte Auftreten von Aktionspotentialen innerhalb eines bestimmten Zeitraumes. Verschiedene Parameter können die *Burst*-Struktur eines neuronalen Netzes beschreiben. *Seite 7*

Cell Monitoring System Das aktuelle CMS[®] wurde an der Universität Rostock, Fachbereich Biowissenschaften, entwickelt und dient der multiparametrischen Beobachtung eines Nervenzellnetzwerkes. Neben dem Stoffwechsel wird auch die elektrische Aktivität erfasst. *Seite 8*

Cluster Punktmenge in einem mehrdimensionalen Raum, die durch die Nutzung bestimmter Merkmale bei der Klassifizierung entstanden ist. *Seite 17*

Dendogramm Ein Dendogramm eine Baumstruktur zur Darstellung der Ergebnisse einer hierarchischen Clusterung. Ein Dendogramm besteht aus Knoten, welche in mehreren Ebenen angeordnet sind. Jeder Knoten repräsentiert einen Cluster. Die Länge der Linien, die die Knoten eines Dendogramms verbinden, kann als Abstand zwischen den einzelnen Clusters interpretiert werden. *Seite 25*

Elektrophysiologie Teilgebiet der Physiologie, das sich mit der Messung elektrischer Erscheinungen im Organismus, ihrer Entstehung und Veränderung bei Tätigkeit befasst; z. B. Aktionspotentialmessung und Elektrokardiografie [457], siehe auch Physiologie. *Seite 1*

False Negative Fehler bei der Detektion von Aktionspotentialen. Aufgrund einer zu hohen Detektionsschwelle werden *Spikes* nicht erkannt. Siehe auch *False Positive*. *Seite 18*

False Positive Fehler bei der Detektion von Aktionspotentialen. Aufgrund einer zu niedrigen Detektionsschwelle wird die Hintergrundaktivität fälschlicherweise als *Spike* eines Neurons interpretiert. Siehe auch *False Negative*. *Seite 18*

Firing Rate Maß zur Beschreibung der Aktivität eines Neurons innerhalb eines bestimmten Zeitraums. Es gibt an wie oft ein Aktionspotential durch ein Neuron „abgefeuert“ wurde. *Seite 21*

Gliazellen Gliagewebe, Neuroglia, bindegewebeähnliches, aus Gliazellen bestehendes Stützgewebe im Zentralnervensystem. Bei Wirbeltieren wird unterschieden zwischen Makroglia und Mikroglia. Die Makroglia, zu denen die Astrozyten und die Oligodendrozyten zählen, erfüllen v.a. Stütz- und Isolierfunktionen. Die Zellen der Mikroglia dienen der Beseitigung von Fremdkörpern und abgestorbenen Nervenzellen [457]. *Seite 49*

Independent Component Analysis Verfahren zur Separation N unabhängiger Signale aus einer linearen Überlagerung dieser Signale mit unbekannter Wichtung auf N verschiedenen Kanälen bzw. Elektroden. Dieser Ansatz wurde ursprünglich für die *Blind Source Separation* entwickelt. *Seite 21*

Inter Spike Intervall Zeitlicher Abstand zwischen aufeinander folgenden Aktionspotentialen. Dieses Merkmal kann zur Beurteilung des Klassifikationsergebnisses von Aktionspotentialen eingesetzt werden kann. Eine Klasse bzw. eine *Unit* sollte kein *Inter Spike Interval* aufweisen, welches kleiner als die Refraktärzeit einer Zelle ist. Siehe auch Refraktärzeit.

in-vitro Lateinisch vitrum „Glas“, im Reagenzglas ablaufend oder durchgeführt (z. B. biologische Vorgänge, wissenschaftliche Experimente); Gegensatz: in vivo [457]. *Seite 1*

in-vivo Lateinisch vivus „lebendig“, am lebenden Objekt ablaufend oder durchgeführt (biologische Vorgänge, wissenschaftliche Experimente); Gegensatz: in vitro [457]. *Seite 1*

Matched Filter *Matched Filter*, Optimalfilter bzw. angepasste Filter werden genutzt, um ein bekanntes Muster mit z. B. aufgenommenen Daten zu vergleichen. Zu diesem Zweck werden Muster und Daten gefaltet. *Seite 20*

Metabolismus Der Metabolismus bzw. der Stoffwechsel steht für die Gesamtheit der physiologischen Vorgänge, die im lebenden Organismus ablaufen und dem Aufbau und der Erhaltung der Körpersubstanz sowie der Aufrechterhaltung der Körperfunktionen dienen [457]. *Seite 1*

Neuro-Sensor *Silizium-Hybrid Netzwerksensor* Sensor der die multiparametrische Erfassung eines Zellverbandes ermöglicht. Neben der Messung physiologischer Parameter können auch so genannte Aktionspotentiale, die einen Großteil der elektrischen Zellaktivität charakterisieren, detektiert und aufgezeichnet werden. Siehe auch MEA (Abkürzungsverzeichnis). *Seite 2*

offline Analyse Klassifizierung der gemessenen neuronalen Aktivität eines biologischen neuronalen Netzwerkes nach der Beendigung des Experimentes. Für die *Unit*-Separation können alle vorhandenen Messwerte des Experimentes ohne zeitliche Auflagen ausgewertet werden. Somit können z. B. komplexere Algorithmen wiederholt angewendet werden. Eine erneute Klassifikation unter anderen Gesichtspunkten zu einem

späteren Zeitpunkt ist ebenfalls möglich. Je nach angewendetem Verfahren können allerdings beträchtliche Datenmengen anfallen. *Seite 23*

online Analyse Klassifizierung der detektierten Aktionspotentiale erfolgt in Echtzeit während des Experimentes unter Berücksichtigung der bis dahin vorhandenen Informationen. Somit besteht die Möglichkeit den Verlauf eines Experimentes interaktiv zu steuern. Die angewendeten Klassifikationsverfahren müssen die pro Zeiteinheit anfallenden Messwerte bearbeiten können. Bei diesem Verfahren kann die aufzuzeichnende Datenmenge deutlich reduziert werden, da im Bedarfsfall nur die Kurvenform, deren Klassenzugehörigkeit und ein Zeitstempel erfasst werden. Dadurch besteht auch das Risiko eines Datenverlustes. *Seite 23*

Optimal Filtering Klassifikationsmethode, welche im Gegensatz zum *Template Matching*-Verfahren nicht im Zeit- sondern im Frequenzbereich angewendet wird. Ausgehend von einem *Template* wird ein Filter entworfen, der nur auf dieses *Template* reagiert und weitere Kurvenformen sowie Rauschen ignoriert. *Seite 42*

Patch Clamp Methode zur intrazellulären Messung der elektrischen Zellaktivität. Mittels feiner Glaspipette wird die Zellmembran des zu untersuchenden Neurons geöffnet, so dass eine direkte elektrische Verbindung zum Inneren des Zellkörpers besteht. Die so durchgeführte Messung besitzt ein gutes Signalrauschverhältnis kann aber nur an einzelnen Neuronen für relativ kurze Zeit durchgeführt werden. *Seite 1*

Pattern Matrix Die *Pattern Matrix* bzw. Mustermatrix repräsentiert jedes Klassifikationsobjekt mittels eines Merkmalsvektors. Dieser mehrdimensionale Vektor wird als Muster des Objektes interpretiert. Für jedes Objekt werden dabei die selben Merkmale ermittelt. Die Abtastwerte eines Aktionspotentials können diesen Merkmalsvektor bilden [217]. Siehe auch *Proximity Matrix*. *Seite 23*

pH-Wert Lateinisch für *potentia hydrogenii* „Stärke (Konzentration) des Wasserstoffs“, von dem dänischen Chemiker S. P. L. Sørensen 1909 eingeführte Maßzahl für die in Lösungen enthaltene Konzentration an Wasserstoffionen, H^+ (beziehungsweise Hydroniumionen, H_3O^+), das heißt für den sauren oder basischen Charakter einer Lösung. Der pH-Wert wird als negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration $c(H^+)$ beziehungsweise der Wasserstoffionenaktivität $a(H^+)$ angegeben. In reinem Wasser ergibt sich die Konzentration an Hydroniumionen aus der elektrolitischen Eigendissoziation des Wassers: $2 H_2O \leftarrow H_3O^+ + OH^-$ [457]. *Seite 14*

Physiologie Wissenschaft und Lehre von den normalen, auch den krankheitsbedingten Lebensvorgängen. Die Physiologie versucht mit physikalischen, chemischen und molekularbiologischen Methoden die Reaktionen und Abläufe von Lebensvorgängen, wie z. B. Wachstum, Entwicklung und Fortpflanzung, bei Organismen beziehungsweise ihren Zellen, Geweben oder Organen aufzuklären [457], siehe auch Elektrophysiologie.

Proximity Matrix Die *Proximity Matrix* bzw. Nachbarschaftsmatrix ist eine notwendige Voraussetzung für die nachfolgende Klassifizierung. Die Einträge dieser Matrix können als paarweises Maß der Nähe, der Ähnlichkeit oder der Verwandtschaft zwischen einzelnen Mustern aufgefasst werden. Die Matrix ist symmetrisch. Die Matrixeinträge können z. B. als Euklidische Distanz (Maß der Verschiedenheit) oder als Korrelationskoeffizient (Ähnlichkeitsmaß) erfolgen [217]. Siehe auch *Pattern Matrix*. Seite 24

Refraktärzeit Zeitdauer zwischen zwei Aktionspotentialen eines Neurons, in der die Zelle nicht mit neuen Aktionspotentialen auf einen Reiz reagiert. Diese Zeitdauer, auch *Refractory Period* genannt, beträgt bei den meisten Zellen mindestens 1 ms. Siehe auch *Inter Spike Intervall*. Seite 18

Spike Oft verwendetes Synonym für den Begriff Aktionspotential. Seite 18

Template Schwerpunkt eines Clusters, der aufgrund der Klassifikation verschiedener Merkmale entstanden ist. Seite 17

Template Matching Klassifikationsverfahren, bei dem ausgehend von bereits vorhandenen Mustern eine Klasseneinteilung des aktuellen Datensatzes vorgenommen wird. Dabei können verschiedene Distanzmaße zur Anwendung kommen. Bei MEA-Experimenten sollte eine Klasse der Signalform eines Neurons entsprechen. Siehe auch *Unit-Separation*. Seite 3

Unit Anonyme Bezeichnung einer Klasse von Aktionspotentialen, die einem Neuron des Netzwerkes zugeordnet wird. Siehe auch *Unit-Separation*. Seite 18

Unit-Separation Da prinzipiell Signale mehrerer Neuronen mit einer MEA-Sensorelektrode aufgenommen werden können, erfolgt oft eine Zuordnung der einzelnen Signalformen zu dem Neuron, welches höchst wahrscheinlich das Signal generiert hat. Da diese Neuronen in der Zellkultur physisch nur schwer lokalisiert werden können, spricht man anonym von *Units*. Der Klassifikationsvorgang wird damit auch *Unit-Separation* genannt. Siehe auch *Template Matching*. Seite 5

Wavelet Packet Variante der *Wavelet*-Transformation, bei der nicht nur der niederfrequente Signalanteil, also die Approximation, sondern auch der hochfrequente Signalanteil, die Detailinformationen, mehrstufig zerlegt werden. Seite 22

Wavelet-Transformation Transformation bei der die verwendeten Basisfunktionen, die so genannten *Wavelets*, im Gegensatz zur Fourier-Transformation sowohl im Frequenz- als auch im Zeitbereich lokalisiert sind. Bei dieser Methode werden die Ausgangsdaten mit unterschiedlich skalierten *Wavelets* in mehreren Stufen analysiert. Aufgrund der unterschiedlich skalierten Basisfunktionen spricht man auch von einer *Multiresolution Analysis*. Seite 18