

**Untersuchung von Verarbeitungsalgorithmen zur automatischen
Auswertung neuronaler Signale aus Multielektroden-Arrays**

Dissertation
zur
Erlangung des akademischen Grades
Doktor-Ingenieur (Dr.-Ing.)

der Fakultät für Informatik und Elektrotechnik
der Universität Rostock

vorgelegt von
Gerold Bausch, geboren am 21. August 1979 in Erlabrunn
aus Leipzig

Leipzig, 10. Juni 2012

1. Gutachter:

Prof. Dr.-Ing. habil. Helmut Beikirch
Universität Rostock
Fakultät für Informatik und Elektrotechnik
Institut für Gerätesysteme und Schaltungstechnik
Albert-Einstein-Straße 2, 18051 Rostock

2. Gutachter:

Prof. Dr.-Ing. Bernd Henning Universität Paderborn
Institut für Elektrotechnik und Informationstechnik
Elektrische Messtechnik
Warburger Straße 100, 33098 Paderborn

3. Gutachter:

Prof. Dr.-Ing. Matthias Sturm
Hochschule für Technik, Wirtschaft und Kultur Leipzig
Fakultät für Elektrotechnik und Informationstechnik
Institut für Prozessautomation und Eingebettete Systeme
Wächterstraße 13, 04107 Leipzig

Tag der Einreichung: 8. Februar 2011

Tag der Verteidigung: 28. Oktober 2011

Vorwort

There is a severe danger that increases in speed and volume of data generation
could lead to decreases in comprehension of the results.

Stephen H. Muggleton, »Exceeding human limits«, Nature, 2006

Die vorliegende Arbeit entstand über zwei Stationen in Rostock und Leipzig. Begonnen wurde sie an der Universität Rostock im Rahmen des Projekts „Neuronaler Silizium-Hybrid-Netzwerksensor zum Monitoring neuronaler Aktivitätszustände und Substanzwirkungen“. Ein Teilaspekt dieses Projekts bestand aus Untersuchungen zur automatischen Signalauswertung der aus Multielektroden-Arrays abgeleiteten Zellsignale. Möglich wurde dieses Projekt durch die interdisziplinäre Zusammenarbeit zahlreicher kompetenter Biologen, Physiker und Ingenieure.

Die wissenschaftliche Betreuung dieser Arbeit erfolgte durch Prof. Dr.-Ing. habil. Helmut Beikirch. Ihm gilt mein besonderer Dank. Hilfreiche Diskussionen, wichtige Denkanstöße sowie kleinere und größere Zusätze habe ich einer Vielzahl von Mitarbeitern und Freunden aus Rostock zu verdanken, unter anderem Dr. René Schrott, Carsten Tautorat, Dr. Klaus-Peter Kirchner und Dr. Werner Baumann.

Weitergeführt und abgeschlossen wurde diese Arbeit im Rahmen meiner Tätigkeiten in Leipzig. Das dies ermöglicht wurde, habe ich einzelnen Mitarbeitern der HTWK Leipzig und des Forschungs- und Transferzentrums Leipzig e.V. zu verdanken. Mein besonderer Dank gilt vor allem Prof. Dr.-Ing. Matthias Sturm, der mich während der gesamten Promotionsphase begleitet und unterstützt hat und immer wieder mit Rat und Tat zur Seite stand.

Darüber hinaus haben auch enge Freunde und Familienangehörige während der Entstehungsphase dieser Arbeit einen kleineren oder größeren Fußabdruck hinterlassen. Sei es durch unzählige Motivationen jeglicher Art, unterstützende Hinweise, das Entwirren und Umstellen diverser (in meinen Augen sehr wissenschaftlich formulierter) Sätze und beim Versuch, alle Rechtschreibfehler zu finden. Danke für eure Geduld und moralische Unterstützung!

Gerold Bausch

Kurzfassung

Multielektroden-Arrays (MEAs) dienen der Ableitung von Signalen aus lebenden Zellen oder Gewebeschichten. Mit Hilfe einer Sensormatrix können viele Zellen gleichzeitig kontaktiert und deren elektrische Aktivität in Form von Aktionspotenzialen (engl. *Spikes*) kapazitiv abgeleitet werden. Aufgrund ihrer Sensorgröße bestehen die abgeleiteten Signale sowohl aus der Überlagerung mehrerer Zellen sowie instationärer Rauschteile. Für eine Analyse der Zellsignale ist eine vorherige Trennung des Signalgemischs in seine Einzelbestandteile erforderlich. Dieser Vorgang wird auch als *Spike sorting* bezeichnet.

Während einzelne Verarbeitungsschritte des *Spike sortings* bisher nur manuell durchgeführt werden können, erfordert die zunehmende Erhöhung der Sensoranzahl auf einem MEA aber auch der Einsatz von hochkanaligen MEAs in kommerziellen Systemen eine durchgehend automatische Signalverarbeitung und -analyse.

In der vorliegenden Arbeit werden Ansätze zu einer vollständig automatischen Signalverarbeitung vorgestellt und untersucht. Dabei werden Verfahren aufgezeigt, die mit Hilfe von künstlichen neuronalen Netzen die notwendige Flexibilität und Anpassungsfähigkeit bieten, um Signale mit unbekanntem Eigenschaften optimal zu filtern und automatisch in seine Einzelkomponenten zu zerlegen. Das Ergebnis dieser Arbeit ist ein mehrstufiges Verfahren, bei dem die bisher von Experten manuell einzustellenden Parameter durch statistische Verfahren ersetzt wurden. Dadurch können abgeleitete Signale deutlich schneller als bisher analysiert werden. Durch den vollständig rechnerbasierten Lösungsansatz ist dadurch auch erstmalig eine echtzeitbasierte Auswertung einer sehr hohen Sensoranzahl möglich.

Abstract

Multi-electrode arrays (MEAs) are used for deriving signals from living cells or tissue sections. By means of a sensor array, many cells are connected simultaneously and their electrical signals are recorded capacitively in the form of action potentials. Due to the size of the sensor area, the signal is a superposition of an unknown number of neural sources and non-stationary noise components. In order to analyze the recorded signal, a prior separation into its individual components is required. This process is known as spike sorting.

While the individual steps of spike sorting still require manual selection of different parameters, the increasing number of sensors on a MEA surface demand an automatic spike sorting procedure. An unsupervised and real-time spike sorting method would further enable sophisticated commercial applications with high-channel MEAs.

In this thesis, two new approaches for an automatic spike sorting process have been developed and tested. These approaches are based on artificial neural networks to ensure high flexibility and adaptivity. This enables an unsupervised separation of components from signals with an unknown structure. The result of this work is a multistage process in which the manual parameters have been replaced with statistical methods. Thus the recorded signals can be analyzed much faster compared to previous methods. Due to the entire computer-based approach, an unsupervised and real-time analysis of many signals in parallel is now possible.

Inhaltsverzeichnis

Tabellenverzeichnis	xi
Abbildungsverzeichnis	xiii
1 Einleitung	1
1.1 Thematischer Hintergrund	1
1.2 Aufbau der Arbeit	3
2 Problemstellung	7
3 Stand von Wissenschaft und Technik	11
3.1 Signableitung	11
3.1.1 Sensortechnologie	12
3.2 Signalvorverarbeitung	20
3.2.1 Filterung	21
3.2.2 Signaldetektion	25
3.3 Merkmalsextraktion	30
3.4 Clusteranalyse	32
3.5 Parallelisierung von Algorithmen	36
3.6 Datenaustausch	37
3.7 Methoden zur Validierung	37
3.8 Zusammenfassung und vorläufige Bewertung	39
4 Aufgabenstellung	43
5 Untersuchungen zur automatischen Klassifikation von Aktionspotenzialen	45
5.1 Vorbetrachtungen	45
5.2 Verwendung und Erzeugung von Testsignalen	47
5.3 Vergleich von Basis-Wavelets zur Signalfilterung	49
5.4 Wavelet-Transformation von finiten Signalen	54
5.5 Erweitertes Wavelet Denoising	57
5.6 Adaptives Verfahren zur Merkmalsextraktion	61
5.7 Clusteranalyse extrahierter Merkmale	66
5.8 Zusammenfassung	67

6	Bewertung und Diskussion	71
6.1	Signalfilterung	72
6.2	Extraktion von Merkmalen in Echtzeit	79
6.3	Clusteranalyse	82
6.4	Zusammenfassung	83
7	Zusammenfassung und Ausblick	87
	Literaturverzeichnis	91
A	Cell Monitoring System	123
A.1	Eigenschaften des Multielektroden-Arrays	123
A.2	Software zur Ansteuerung und Signalauswertung	127
B	Teager Energy Operator	131
C	Simulationsparameter	133
C.1	Verzeichnisstruktur der Datensätze und Matlab-Scripte	133
C.2	Filter	133
C.3	Testsignalgenerierung	134
C.4	Vergleich unterschiedlicher Wavelets	135
C.5	Eigene Matlab-Funktionen	135
D	Softwarepakete	137
D.1	Open-Source Software	137
D.2	Kommerzielle Software	139
	Glossar	147

Tabellenverzeichnis

3.1	Elektrische Eigenschaften von Neuronen und neuronalen Netzen.	13
3.2	Planare Multielektroden-Arrays und ihre Eigenschaften.	16
3.3	Kommerziell erhältliche Multielektroden-Arrays und ihre Eigenschaften.	20
5.1	Minimale Sequenzlängen für ausgewählte Basiswavelets und Zerlegungsstufen. . . .	57
6.1	Vergleich zwischen neuronaler und klassischer Hauptkomponentenanalyse.	80
6.2	Fehlerhafte und richtige Zuordnung von <i>Units</i> beim automatischen <i>Spikes sorting</i> .	84

Abbildungsverzeichnis

1.1	Intrazelluläre Signalableitung mit Hilfe der <i>Patch clamp</i> -Technologie	2
2.1	Ableitung von Zellsignalen mit einem Sensorarray	7
2.2	Stromverlauf eines extern abgeleiteten Signals.	8
2.3	Vollständige Signalverarbeitungskette bei der Ableitung von Aktionspotenzialen. . .	8
2.4	Einzelne Verarbeitungsschritte beim <i>Spike sorting</i>	9
3.1	Elektrisches Modell zur kapazitiven Ableitung von Spannungen	12
3.2	Schematische Darstellung des MTEO-Verfahrens.	27
4.1	Die rot gekennzeichneten Verarbeitungsschritte werden innerhalb dieser Arbeit ge- nauer untersucht.	43
5.1	Morphologische Eigenschaften von unterschiedlichen Basis-Wavelets.	50
5.2	Fehleranalyse unterschiedlicher Basis-Wavelets mit Hilfe der Kovarianz	52
5.3	Fehleranalyse unterschiedlicher Basis-Wavelets mit Hilfe des mittleren quadratischen Fehlers	52
5.4	<i>Denoising</i> mit <i>soft threshold</i> durch Schätzung von σ_{noise} aus D_1	53
5.5	<i>Denoising</i> mit <i>soft threshold</i> durch Schätzung von σ_{noise} aus D_1 bis D_5	53
5.6	Visueller Vergleich der Signalverformung beim <i>Detrending</i> und <i>Denoising</i>	55
5.7	Vergleich eines ungefilterten mit einem waveletgefilterten Signalausschnitt	55
5.8	Redundante Wavelet-Transformation	56
5.9	Vergleich zwischen ungefiltertem sowie gefensterter und redundant gefensterter DWT beim <i>Detrending</i>	56
5.10	Programmablaufplan des <i>Enhanced Wavelet Denoising</i>	59
5.11	Verwendung von Koeffizienten zur adaptiven Schätzung des Rauschanteils	60
5.12	Vergleich zwischen Originalsignal und unterschiedlich gefilterten Signalen	60
5.13	Vergleich der Spektren zwischen Originalsignal und unterschiedlich gefilterten Signalen	61
5.14	Erweiterung von <i>Enhanced Wavelet Denoising</i> für hochauflösende Multielektroden- Arrays	61
5.15	Einfaches lineares neuronales Netz zur Extraktion von Hauptkomponenten.	63
5.16	Visueller Vergleich der Merkmalsextraktion zwischen klassischer und neuronaler PCA bei zwei <i>Units</i>	64

5.17	Visueller Vergleich der Merkmalsextraktion zwischen klassischer und neuronaler PCA bei drei <i>Units</i>	64
5.18	Vergleich zwischen Offline- und Online-PCA für vier unterschiedliche Sensoren bei realen Daten	65
5.19	Automatische Bestimmung der Anzahl der Cluster mit <i>x</i> -means für zwei bzw. drei Cluster	68
6.1	Visueller Vergleich der Separation von zwei Clustern, die bei unterschiedlichen Signalausabständen mit <i>VisuShrink</i> und dem <i>Enhanced Wavelet Denoising</i> entstört wurden	78
6.2	Visueller Vergleich der Merkmalsextraktion von zwei bzw. drei Units	81
6.3	Verwendete Signalformen für Aktionspotenziale bei künstlich erzeugten Signalen . .	83
A.1	Neurochip und REM-Aufnahme einer passiven Palladium-Elektrode mit kultivierten Zellen	123
A.2	Abmessung der Elektroden des BISC02	124
A.3	Darstellung des Gesamtsystems aus BISC-Chip und Neuromessadapter.	125
A.4	Softwarekonzept	129
A.5	Software <i>BISCRecorder</i> zur einfachen Konfiguration aller Hardwarekomponenten. .	130
A.6	Software <i>BISCInspector</i> dient der visuellen Darstellung der abgeleiteten Signale. . .	130
B.1	Vergleich beider TEO-Versionen.	132

1 Einleitung

1.1 Thematischer Hintergrund

Das menschliche Gehirn mit seinen 10^{11} Nervenzellen und 10^{15} synaptischen Verbindungen stellt eines der komplexesten biologischen Systeme dar, welches bereits im Mittelpunkt unzähliger interdisziplinärer Forschungsvorhaben stand und immer noch steht [1].

Obwohl die Neurowissenschaften innerhalb der vergangenen Jahrzehnte enorme Fortschritte gemacht haben, sind wir weiterhin nicht in der Lage, die komplexen Vorgänge im menschlichen Gehirn zu entschlüsseln und in ihrer Gesamtheit zu verstehen oder zu interpretieren. Während einfache Vorgänge auf Zellebene ausgiebig erforscht sind, ermöglichen es modernste Analysemethoden immer noch nicht, komplexe Vorgänge wie Lernen, die Entstehung von Emotionen und Bewusstsein oder Krankheiten wie Depressionen oder Schizophrenie zu untersuchen.

Medizinische Diagnoseverfahren wie die Magnetoenzephalographie (MEG), die Magnetresonanztomographie (MRT) oder die Elektroenzephalografie (EEG) können zwar einige Vorgänge im Gehirn messtechnisch erfassen. Allerdings verfügen Sie nur über eine relativ abstrakte Darstellung, da sie vor allem aktive Gehirnregionen aufgrund des Blutflusses sichtbar machen können. Eine direkte Beobachtung neuronaler Vorgänge auf Zellebene ist damit bisher nicht möglich.

Um elementare Funktionsweisen im Gehirn zu erforschen, ist es nicht nur notwendig, größere Areale auf bestimmte Aktivitäten zu überwachen. Gleichzeitig müsste eine Überwachung einzelner Zellen und deren Interaktion zu benachbarten Zellen erfolgen. Eine Zelle bildet die kleinste biologische Einheit, die Informationen verarbeiten kann. Aufgrund ihrer primitiven Funktionsweise sind einzelne Zellen jedoch nicht in der Lage, komplexe Aufgaben zu übernehmen. Untersuchungen haben ergeben, dass erst durch die Vernetzung von etwa 1000 bis 10000 Nervenzellen Intelligenz möglich wird [2]. Würde es also gelingen, die Arbeitsweise größerer Zellpopulationen und die Kommunikation einzelner Zellen untereinander gleichzeitig zu erfassen und zu entschlüsseln, könnte dies zu einem besseren Verständnis und zu neuen Erkenntnissen der neuronalen Funktionsweise im Gehirn führen.

Der Informationsaustausch von Zellen basiert auf einem kontrollierten Austausch von Ionen, die mit Hilfe von Natrium- und Kaliumkanälen innerhalb der Zellmembran gesteuert werden. Durch einen Stimulus, ausgelöst infolge einer Veränderung des Membranpotenzials, bspw. durch chemische Botenstoffe oder mechanische Verformungen, kommt es zu einer schnellen Öffnung der

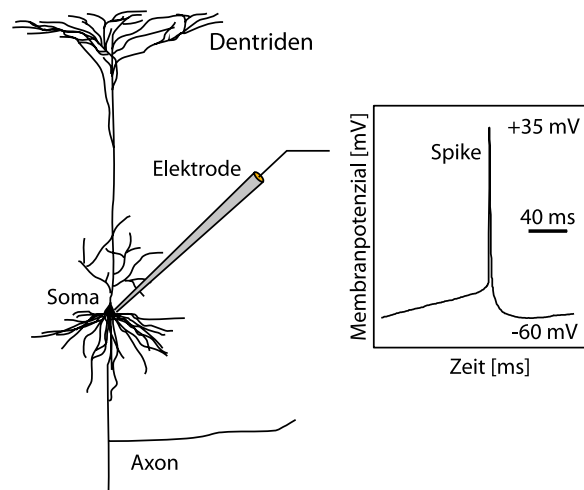


Abbildung 1.1 Intrazelluläre Signalableitung mit Hilfe der *Patch clamp*-Technologie nach [3].

Membrankanäle und zum Austausch von Natriumionen. Dabei steigt die zellinterne Spannung in Bezug auf ihre extrazelluläre Umgebung von etwa -70 mV auf 30 mV . Etwa eine Millisekunde später wird mit Hilfe von Kaliumionen das Ruhepotenzial von -70 mV hergestellt [4, 5]. Diese vorübergehende Abweichung des Membranpotenzials wird als Aktionspotenzial (engl. *Spike*) bezeichnet und dient dem interzellulären Informationsaustausch. Über Synapsen werden diese Impulse mittels Neurotransmitter an die Rezeptoren benachbarter Zellen weitergeleitet.

Bereits in den 1940er Jahren wurden bei ersten Experimenten die äußeren und inneren Zusammenhänge von Zellen untersucht [6, 7] und wenig später auch mathematisch modelliert [8, 9]. Für die Untersuchung kamen anfangs sog. *Voltage clamps*, später auch *Patch clamps* zum Einsatz, die sehr genaue Analysen biochemischer Vorgänge erlauben (vgl. Abbildung 1.1). Bei diesen Verfahren werden Elektroden, die sich an der Spitze gläserner Mikropipetten befinden, auf die Zellmembran aufgesetzt. Durch die Verbindung können Ströme im Pikoampere-Bereich (pA) aus der Zelle abgeleitet werden, die das Öffnen und Schließen der Ionenkanäle sichtbar machen [10]. Durch stärkeres Ansaugen kann die Zellmembran sogar aufgerissen (*inside-out patch*) und Ströme von der gesamten Zelle abgeleitet werden [11].

Obwohl diese Technologie eine gute Ableitung elektrischer Signale aus einzelnen Kanälen oder ganzen Zellen erlaubt, ist die Applikation von *Patch clamps* an einer einzelnen Zelle sehr aufwändig und macht die Beobachtung großer Zellpopulationen nahezu unmöglich. Zudem werden durch die Penetration beim *inside-out patch* die Zellen zerstört, so dass notwendige Langzeituntersuchungen nicht möglich sind.

Eine Alternative dazu bietet die kapazitive Signalableitung über elektrische Felder. Anfang der 1970er Jahre wurden planare Elektroden mittels Dünnschichttechnik auf Glasträgern aufgedampft und die zu untersuchenden Zellen auf dem Träger kultiviert [12]. Durch eine matrizenartige Anordnung vieler Sensoren konnten damit erste Vielfachableitungen mit sogenannten Multielektroden-Arrays (MEA) aus Zellkulturen und Gewebeschnitten realisiert werden [13–16].

Mit der Überwachung größerer Zellareale können so Impulsraten von Aktionspotenzialen einzelner Zellen sowie die Kommunikationsmuster vieler Zellen (sog. *Spike trains*) erfasst und bei bekannten äußeren Reizen als „Fingerabdruck“ gespeichert werden [4, 17]. Die erfassten Impulsraten repräsentieren dabei die Reizintensität einzelner Zellen. Bekannte *Spike trains* großer Zellareale können so zur Analyse unbekannter Reizauslöser genutzt werden.

Das Interesse der Informationsgewinnung aus lebenden Zellkulturen gewinnt innerhalb verschiedener Forschungs- und Anwendungsbereiche immer mehr an Bedeutung. Besonders großes Interesse besteht in der Verbindung von organischem Material mit leistungsfähiger Elektronik zu sogenannten hybriden Systemen, bei denen der Geschwindigkeitsvorteil moderner Rechnersysteme mit den sensorischen Fähigkeiten lebender Zellnetzwerke gekoppelt werden. Die Visionen für den Einsatz solcher hybriden Systeme reichen von der Grundlagenforschung über neue Verfahren in der (medizinischen) Diagnostik bis hin zur Analyse von Umwelteinflüssen, die nur mit sehr sensibler Sensorik möglich sind [18–23]. Denkt man noch einen Schritt weiter, könnte die Verbindung zwischen Elektronik und menschlichen Nervenzellen zu neuartigen Prothesen führen, bei denen künstliche Körperteile direkt mit dem Gehirn kommunizieren und von ihm gesteuert werden [24–32].

Abseits der vielen Visionen werden bereits hybride Systeme in der medizinischen Diagnostik erforscht. Anhand unterschiedlicher Experimente [33–37] konnte nachgewiesen werden, dass chemische Substanzen auf neuronale Aktivitäten erregend oder hemmend wirken. Im Mittelpunkt der aktuellen Forschung steht deshalb die Untersuchung verschiedener Wirkstoffe [38–40] auf Zellkulturen sowie die Erstellung von Datenbanken mit Kommunikationsmustern aus Zellverbänden. Diese Erkenntnisse sollen zur Analyse noch unbekannter Wirkstoffe und Substanzen eingesetzt werden, um damit exakter und frühzeitig die gewünschten Wirkungen auf unterschiedliche Genotypen untersuchen zu können. Nebenwirkungen könnten damit schneller erfasst und Medikamente auf individuelle Verträglichkeiten getestet werden [41–49].

1.2 Aufbau der Arbeit

Diese Arbeit beschäftigt sich mit der Erfassung neuronaler Signale aus hybriden Systemen und vor allem mit der Aufbereitung und Auswertung der abgeleiteten Zellsignale.

In Kapitel 2 erfolgt eine Beschreibung von Problemen und Hindernissen, die bei der Ableitung von elektrischen Signalen aus Zellen mit hybriden Systemen auftreten. Die abgeleiteten Signale können ohne eine weitere Vorverarbeitung nicht interpretiert und analysiert werden. Dazu sind komplexe Verarbeitungsschritte notwendig, die aus dem Signalgemisch die notwendigen Informationen extrahieren. Die dazu notwendigen Schritte werden ebenfalls in diesem Kapitel erläutert.

Kapitel 3 analysiert den aktuellen Stand von Wissenschaft und Technik mit dem Ziel, die unterschiedlichen Sensorentwicklungen und die bisher verwendeten Verfahren zur Auswertung der neuronalen Signale vorzustellen. Im Mittelpunkt der Sensortechnik stehen dabei insbesondere die physikalischen Sensoreigenschaften sowie die sich daraus ableitende Signalqualität. Die Signalqualität bzw. die Eigenschaften der abgeleiteten Signale sind relevant bei der richtigen Auswahl und Konfiguration der zur Verfügung stehenden Signalverarbeitungsalgorithmen. Aufgrund der Vielzahl an unterschiedlichen Sensorentwicklungen und den damit einhergehenden Signaleigenschaften existiert eine Vielzahl an Verarbeitungsalgorithmen, deren wichtigste Vertreter in diesem Kapitel ausführlich vorgestellt werden.

In Kapitel 4 erfolgt eine genaue Beschreibung der offenen Probleme, die sich aus Kapitel 2 und Kapitel 3 ergeben und die im weiteren Verlauf der Arbeit genauer untersucht werden sollen. Der Autor konzentriert sich dabei nicht auf die Weiterentwicklung der Sensormatrizen (Hardware), sondern auf die Auswertung der abgeleiteten neuronalen Signale (Algorithmen).

Eines der bisher ungelösten Probleme bei der Auswertung neuronaler Signale, die mittels MEA-Technologie abgeleitet werden, besteht in den immer noch vorhandenen manuellen Auswertungsschritten. Obwohl bereits einige Verarbeitungsschritte automatisiert werden konnten, benötigen wesentliche Teilschritte in der Signalverarbeitungskette manuelle Eingriffe. Um die Anzahl manueller Eingriffe zu reduzieren, werden in Kapitel 5 Lösungsvorschläge gemacht und diese genauer untersucht. Ziel soll es sein, ein vollständig automatisiertes System zu erreichen, welches von der Ableitung der Signale aus Zellen bis zu den komplexen Kommunikationsmustern (*spike trains*) vollständig autonom arbeitet. Nur so kann das vollständige Potenzial der MEA-Technologie ausgeschöpft werden und die Visionen in den einzelnen Anwendungsbereichen weiter verfolgt werden.

Eine Bewertung und Diskussion der erreichten Ergebnisse schließt sich mit dem Kapitel 6 an. Hier werden die Resultate aus Kapitel 5 mit der Aufgabenstellung aus Kapitel 4 verglichen und ausführlicher diskutiert.

Während der Arbeit wurden notwendige Hardware- und Softwarekomponenten entwickelt, um eine MEA-Eigenentwicklung der Universität Rostock an einen PC zu koppeln. Sowohl technische Eigenschaften des MEAs als auch der Hardware- und Softwarekomponenten werden in Anhang A vorgestellt.

Letztendlich werden die erreichten Ergebnisse in Kapitel 7 zusammengefasst und weiterführende Ideen, die während der Bearbeitungsphase entstanden sind, in einem Ausblick dargestellt.

Die in dieser Arbeit untersuchte Thematik beinhaltet zum Teil Begrifflichkeiten aus den Bereichen Medizin und Biologie. Da diese meist der englischen Sprache entnommen wurden, erfolgt bei ihrer ersten Verwendung eine kurze Erläuterung. Im Text werden diese dann in *kursiver Schrift*

dargestellt, um umständliche und lange Formulierungen zu vermeiden. Eine Erläuterung dieser Begriffe befindet sich im Glossar am Ende dieser Arbeit.

2 Problemstellung

Es existieren bislang unterschiedliche Methoden für die Überwachung von Neuronenpopulationen hinsichtlich dem Austausch individueller elektrischer Informationen. Werden Signale mittels *Patch clamp*-Technologie abgeleitet, ist aufgrund der direkten und niederohmigen Verbindung zwischen Sensor und Zelle nur wenig zusätzlicher Aufwand in der sich anschließenden Signalverarbeitung notwendig. Da der Kontakt lediglich mit einer einzelnen Zelle hergestellt wird, werden kaum andere Signale abgeleitet, die das Nutzsignal stören. Jedoch ist eine manuelle Applikation von *Patch clamps* sehr aufwändig und eignet sich deshalb in der Praxis nur für die gleichzeitige Kontaktierung von wenigen Zellen.

Für eine Ableitung elektrischer Signale aus größeren Zellpopulationen haben sich deshalb sogenannte Multielektroden-Arrays (MEAs) bewährt, die Signale kapazitiv aus den Zellen ableiten. Während sich hierdurch eine größere Anzahl an Neuronen gleichzeitig kontaktieren lässt, verändert sich die elektrische Verbindung zwischen Zellen und Sensor im Vergleich zu *Patch clamps*.

Das auf der Sensoroberfläche aufgetragene Zellmaterial wird durch Zufuhr von Nährstoffen und Gasen am Leben erhalten und führt dadurch zum ständigen Wachstum der Zellen sowie zur Bildung von Verbindungen untereinander [50, 51]. Aufgrund dieser Wachstumsprozesse sowie der Größe der einzelnen Sensoren, die je nach Wahl des eingesetzten Zellmaterials die Größe einer Zelle übersteigen, kann sowohl die Lage als auch die Anzahl der Neuronen zu einem Sensor nicht beeinflusst werden (vgl. Abbildung 2.1). Es existieren zudem bisher keine praktikablen Methoden, Zellen gezielt an bestimmten Positionen zu fixieren [52, 53]. Daher sind ohne optische Verfahren keine Informationen über Anzahl und Lage von Zellen auf der Sensoroberfläche vorhanden.

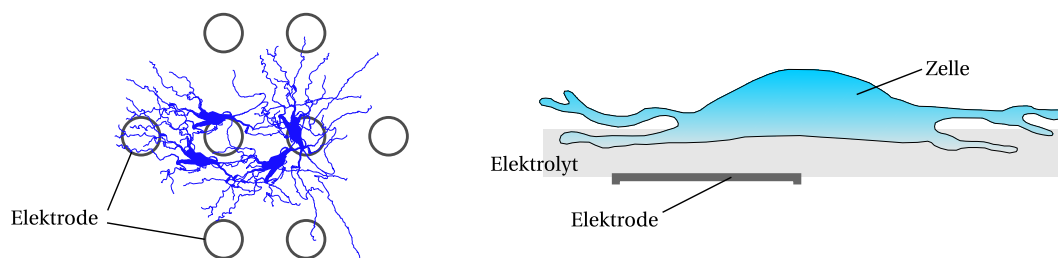


Abbildung 2.1 Stochastische Verteilung von Zellen (blau) auf einem Mikroelektroden-Array (links). Durch den Abstand zwischen Zelle und Sensor kommt es zu einer hohen Signaldämpfung abgeleiteter Zellsignale sowie zur Einkopplung von Störsignalen (rechts, Abbildung nicht maßstabsgetreu).

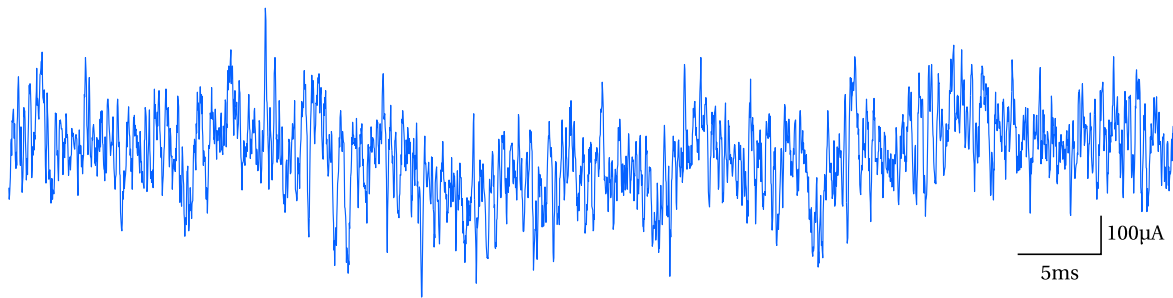


Abbildung 2.2 Stromverlauf eines extern abgeleiteten Signals.

Das abgeleitete Signal aus einem Sensor besteht daher aus der Überlagerung unterschiedlicher Komponenten, die sich im Wesentlichen aus einer unbekanntem Anzahl an abgeleiteten Aktionspotenzialen sowie zeitlich variierenden Störsignalen zusammensetzt, die entweder durch lokale Feldpotenziale oder durch weiter entfernte Neuronen erzeugt werden. Aufgrund der verwendeten Sensortechnik besitzen sowohl Aktionspotenziale als auch Störsignale häufig sehr ähnliche Amplituden (siehe Abbildung 2.2). Für eine Auswertung der Kommunikationsmuster ist es erforderlich, dass eine Zuordnung eines individuellen Aktionspotenzials im abgeleiteten Sensorsignal erfolgt und zeitlich erfasst werden kann. Daher ist eine aufwändige analoge sowie digitale Signalaufbereitung und -auswertung notwendig.

Nach der Ableitung der Signale erfolgt meist eine analoge Vorverstärkung sowie Digitalisierung der Signale, um die einzelnen Signalbestandteile anschließend mit Hilfe digitaler Signalverarbeitungs-algorithmen wieder zu trennen und die darin enthaltenen Aktionspotenziale (engl. *Spikes*) zeitlich zu erfassen. Die dafür notwendigen Prozesse werden deshalb unter der Bezeichnung *Spike sorting* zusammengefasst (siehe Abbildung 2.3).

Die beim *Spike sorting* anstehende Problematik verhält sich ähnlich dem als *Cocktail-Party*-Problem bzw. als *Blind signal separation* bezeichneten Sachverhalt [54]. Mehrere Signalquellen \vec{s} werden überlagert von Mikrofonen \vec{x} an unterschiedlichen Standorten aufgezeichnet und die darin enthaltenen Komponenten mit Hilfe einer analytischen Bestimmung der Misch- bzw. Wichtungsmatrix \mathbf{A} zerlegt. Der mathematische Zusammenhang wird durch Gleichung 2.1 beschrieben [55].

$$\vec{x} = \mathbf{A}\vec{s} \quad (2.1)$$

Trotz der Vielzahl an Sensoren auf einem Mikroelektroden-Array werden die Signale meist nur von

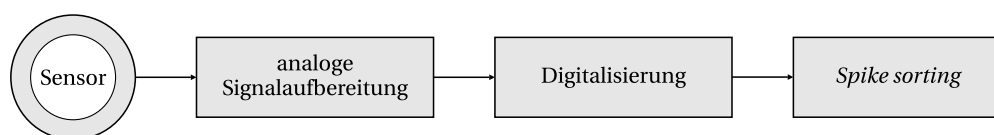


Abbildung 2.3 Vollständige Signalverarbeitungskette bei der Ableitung von Aktionspotenzialen.

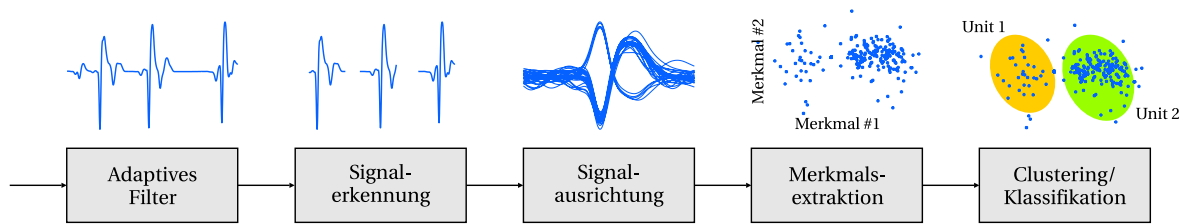


Abbildung 2.4 Einzelne Verarbeitungsschritte beim *Spike sorting*

einem Sensor erfasst und können durch die starke Dämpfung am Übergang von Zelle und Sensor, sowie durch einen sehr hohen Störsignalpegel von umliegenden Sensoren nicht mehr detektiert werden. Die Signalauswertung muss deshalb anhand der Informationen eines Sensors erfolgen. Die analytische Bestimmung einer eindeutigen Lösung über die Wichtungsmatrix \mathbf{A} ist damit jedoch nicht mehr möglich [56].

Obwohl Aktionspotenziale generell in ihrer Form sehr ähnlich sind, ist eine Differenzierung anhand geringer Unterschiede möglich, die hauptsächlich durch Zell-Morphologie und Lage zur Elektrode beeinflusst werden [57]. Die dafür notwendigen Arbeitsschritte sind in Abbildung 2.4 dargestellt.

Ausgehend von einem digitalisierten kontinuierlichen Datenstrom, der bereits analog vorgefiltert wurde, erfolgt eine weitere Filterung mittels adaptiver Filter, die sich entsprechend den zeitlichen Veränderungen von Störsignaleinflüssen anpassen. Anschließend erfolgt die Extraktion der einzelnen *Spikes* sowie eine Ausrichtung an einem gemeinsamen Maxi- oder Minimum. Zur Diskriminierung der extrahierten Signale werden unterschiedliche Parameter erfasst, mit denen sich *Spikes* eines Neurons zusammenfassen lassen, aber auch solche, die sich von Signalen anderer Neuronen unterscheiden. Betrachtet man diese extrahierten Merkmale geometrisch, so entstehen im zwei- oder dreidimensionalen Raum Anhäufungen von Merkmalen. Mit Hilfe eines Clusteralgorithmus werden gemeinsame Eigenschaften mit geringer Intraclustervarianz einer *Unit* zugeordnet. Anhäufungen mit einer großen Interclustervarianz lassen dagegen auf die Anzahl abgeleiteter *Units* schließen.

Problematisch wirken sich in diesem Zusammenhang die meist nur sehr geringen Signalrauschabstände aus, wobei einzelne Rauschpeaks ähnliche Formen wie Aktionspotenziale annehmen können. Trotz aufwändiger Filterstufen entstehen hohe Varianzen in den extrahierten Eigenschaften einzelner *Units*, was zur Überlappung einzelner *Units* führen kann. Eine exakte Unterscheidung ist deshalb nur mit sehr viel Aufwand möglich.

Werden für die Auswertung statische Verfahren verwendet, können diese außerhalb simulierter Umgebungen schnell an ihre Grenzen stoßen und führen zu Fehlinterpretationen abgeleiteter Informationen. So können beispielsweise Wachstums- und Mikrofluidikprozesse auf Sensorchips zu kleinen, aber kontinuierlichen Ortsveränderungen der Zellen in Bezug zu auf die Sensorik führen,

wodurch sich fortlaufende Schwankungen der Signaleigenschaften während eines Experiments ergeben [58].

Ein weiteres Phänomen wird durch sogenannte *Bursts* erzeugt. Diese entstehen, wenn Zellen einer kontinuierlichen Reizung ausgesetzt sind und in sehr kurzen Abständen Aktionspotenziale aussenden. Die notwendige Refraktionszeit zur vollständigen Regenerierung wird dabei nicht erreicht, so dass aufeinander folgende Signale kontinuierlich in ihrer Amplitude gedämpft werden [59].

Um Multielektroden-Arrays optimal für Analyse- und Überwachungszwecke von Zellpopulationen einsetzen zu können, sind sowohl robuste als auch autonom arbeitende Verarbeitungsalgorithmen notwendig, mit denen sich die abgeleiteten hochdynamischen sowie stochastischen Signale auswerten lassen. Mit zunehmender Sensordichte könnten damit neben einer deutlichen Datenreduktion und einem verbessertem Handling der Systeme auch neue Anwendungsfelder im Bereich von Diagnostik, Grundlagenforschung sowie Mensch-Maschine-Interfaces entstehen.

3 Stand von Wissenschaft und Technik

Seit über 60 Jahren werden elektrochemische Vorgänge innerhalb von Zellen untersucht [6]. Durch eine kontinuierliche Verbesserung der Mikrosystemtechnik wurden dabei bis heute große Fortschritte in der Sensortechnik erzielt. Mit Hilfe von CMOS-Prozessen ist es möglich, Sensormatrizen mit einer hohen Sensoranzahl herzustellen. Mit der damit einhergehenden Steigerung der Informationsmenge werden neue Verfahren zur Auswertung benötigt.

Das nachfolgende Kapitel ist in zwei größere Abschnitte untergliedert und gibt jeweils einen Überblick über die Entwicklungen der Sensortechnik sowie die eingesetzten Verfahren und Methoden zur Auswertung der abgeleiteten elektrophysiologischen Signale.

Obwohl der Schwerpunkt dieser Arbeit in der Signalauswertung liegt, haben die einzelnen Entwicklungen der Sensortechnologie einen großen Einfluss auf die notwendigen Verarbeitungsschritte und -algorithmen. Aus diesem Grund erfolgt neben der Vorstellung aktueller Verarbeitungsverfahren und -algorithmen auch eine Bestandsaufnahme zum aktuellen Stand der Technik im Bereich der Sensorentwicklungen.

Aufgrund der hohen Anzahl von Entwicklungen sowohl im Bereich der Sensortechnik als auch den dazu notwendigen Signalverarbeitungsalgorithmen in diesem Forschungsbereich erhebt dieses Kapitel keinen Anspruch auf Vollständigkeit, sondern gibt einen Überblick über wesentliche Entwicklungsschwerpunkte.

3.1 Signableitung

Durch das von Huxley (1963) [8] entwickelte elektrische Zellmodell, das aus der Parallelschaltung von Kapazitäten, regelbaren Widerständen und Spannungsquellen besteht, konnten erste Messmethoden zur Charakterisierung elektrisch erregbarer Zellen entwickelt werden. Dabei handelt es sich um eine passive Variante durch die Ableitung von Strömen (direkt) oder Spannungen (indirekt) sowie einer aktiven Variante durch Bestimmung der Impedanzen.

Seit diesen anfänglichen Untersuchungen haben neue Herstellungsprozesse und Materialien zur Entwicklung einer ganzen Reihe neuartiger (Antikörper-, Enzym-, Nukleinsäure-, Fluoreszenz- und Impedanz-)Sensoren beigetragen, die häufig unter dem Begriff Biosensor zusammengefasst werden. Während diese Sensoren bereits in vielen medizinischen und biologischen Anwendungsbereichen als kommerzielles Produkt erhältlich sind [60–63], stellen die Entwicklungen von Sensoren, mit

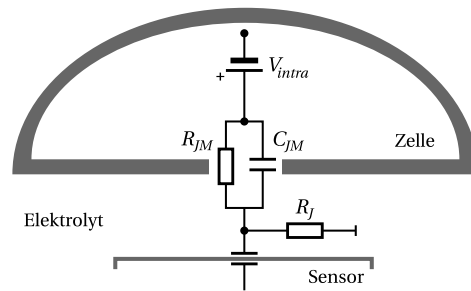


Abbildung 3.1 Elektrisches Modell zur kapazitiven Ableitung von Spannungen mit einer planaren Elektrode nach [66]. Die Größenverhältnisse zwischen Zelle und Sensor sind nicht maßstabsgetreu abgebildet.

denen electrophysiologische Informationen aus Zellnetzwerken abgeleitet werden können, ein größeres Problem dar.

3.1.1 Sensortechnologie

Die Grundlagen zur Ableitung electrophysiologischer Signale aus Zellen wurden mit einfachen metallisierten Elektroden oder Mikroelektroden aus Glaskapillaren gelegt. Bei diesem als *Patch clamp* bezeichneten Verfahren werden Sensoren über eine sog. Gigaohm-Dichtung mit einer Zelle in Kontakt gebracht und ermöglichen damit die Ableitung von kleinsten Ionenströmen im Bereich von Pico- bis Milliampere [11]. Trotz vieler Neuentwicklungen im Sensorbereich wird das *Patch clamp*-Verfahren weiterhin für electrophysiologische Messungen eingesetzt [10, 64].

Die Analyse von Ionenströmen wird neben der Grundlagenforschung vor allem zur Wirkstoffanalyse in der Pharmaindustrie eingesetzt und zählt dort momentan als Goldstandard für Untersuchungen an lebenden Zellen. Einen ausführlichen Überblick über aktuelle Verfahren und kommerzielle Gerätetechnik liefert [65].

Der Vorteil der *Patch clamp*-Technik liegt vor allem in der sehr genauen Untersuchung einzelner Zellen [67, 68]. Durch den sehr guten Kontakt zwischen Sensor und Zelle werden im Vergleich zu neueren Verfahren gute Signalausabstände erzielt. Unterschiedliche Verfahren ermöglichen zudem eine interne und externe Signableitung [4].

Untersuchungen mit diesem Verfahren sind jedoch mit einem hohen manuellen Aufwand verbunden und eignen sich hauptsächlich zur Analyse einzelner Zellen.

Komplexe Vorgänge in Organismen werden nicht durch einzelne Zellen gesteuert, sondern durch die Interaktion mehrerer tausend Zellen, die durch ein Netzwerk verbunden sind. Will man diese Vorgänge analysieren, muss ein vergleichsweise großes Areal an Nervenzellen gleichzeitig untersucht werden. Die herkömmlichen Techniken sind dafür ungeeignet. Eine mögliche Lösung dafür wurde durch das Konzept von planaren Elektroden entwickelt, die in Form einer Matrix auf einer Oberfläche angebracht sind.

Tabelle 3.1 Elektrische Eigenschaften von Neuronen und neuronalen Netzen.

Bezeichnung		Einheit	Min.	Typ.	Max.
Aktionspotenzial	Frequenzanteile ¹	Hz	10		1000
	Amplitude (intrazellulär)	mV _{pp}		100	
	Amplitude (extrazellulär) ¹	μV _{pp}	50		5000
	Dauer	ms	0,3		1
	Spikeintervall	Hz		100	
Soma ¹	Durchmesser	μm	10		100
	Kapazität Membran	pF		40	
	Widerstand Membran	MΩ		490	
Lokale Feldpotenziale	Frequenzanteile	Hz	10		200
	Amplitude	μV _{pp}	10		30
Störanteile ²	Kortikales Rauschen	μV _{pp}	5		10
	Hintergrundrauschen	μV _{pp}	10		30
	Thermisches Rauschen	μV _{pp}		6	

¹ Eversmann, Jenkner, Hofmann *et al.*, 2003.

² Schrott, 2008.

Planare Elektroden ermöglichen neben einer einfacheren Kontaktart zwischen Zelle und Sensor nichtinvasive Messungen und besitzen Vorteile bei der elektrischen Stimulation von Zellen.

Der steigende gerätetechnische Aufwand, der sich durch die Untersuchung größerer Zellverbände mittels *Patch clamp* ergibt, limitiert die Anzahl der gleichzeitigen Untersuchung von Zellen und führte zu neuen Wegen in der Art der Signalableitung. Erste Erfolge wurden mit Systemen erzielt, bei denen Sensoren in Form einer Matrix auf Glasoberflächen aufgedampft wurden. Aufgrund der großen Sensoranzahl werden diese Systeme als Multielektroden-Arrays (MEA) bezeichnet.

Eine große Herausforderung stellt die direkte Verbindung zwischen Elektronik und Zellen dar. Elektronische und biologische Systeme arbeiten mit unterschiedlichen Ladungsträgern, Elektronen und Ionen, die nicht direkt gekoppelt werden können. Der Stromfluss von einem Ionenleiter in einen elektrischen Leiter führt zu elektrochemischen Prozessen, die einerseits zu Zellschädigungen führen und zum anderen Metall- bzw. Halbleiteroberflächen korrodieren lassen. Die Sensoroberflächen müssen aus diesem Grund mit einer Passivierungsschicht überzogen werden, die den elektrochemischen Ladungstransport unterbindet. Ein Austausch elektrischer Signale kann daher nur kapazitiv über elektrische Felder erfolgen [5].

Durch eine zusätzliche Passivierungsschicht entstehen größere Abstände zwischen Zelle und Sensor, so dass kapazitiv abgeleitete Signale in ihrer Amplitude deutlich gedämpft werden.

In Tabelle 3.1 sind die wichtigsten Parameter einzelner Neuronen bzw. neuronaler Netzwerke dargestellt. Während sich interne Spannungsänderungen in Bezug auf die äußere Umgebung im

Bereich von bis zu 100 mV bewegen, werden mittels extrazellulärer Ableitung deutlich geringere Signalamplituden erreicht. Dies ist abhängig von der verwendeten Zellart und liegt im Bereich von 100 μ V für Rattenneuronen bis 10 mV für Herzmuskelzellen [5, 69]. Typische Zelldurchmesser liegen im Bereich zwischen 10 μ m (bei Wirbeltieren) und 100 μ m (bei Wirbellosen). Die Dauer eines Aktionspotenzials beträgt ca. 0,3 ms bis 1,0 ms [69], wobei Neuronen mit bis zu 100 Spikes pro Sekunde feuern können.

Amplitude und Dauer von Aktionspotenzialen eines Neurons sind dabei nahezu konstant. Die zu übertragenden Informationen werden nicht in der Signalform eines Spikes, sondern in ihrer Wiederholrate kodiert.

Neben den Signalfrequenzen, die durch Aktionspotenziale erzeugt werden, sind weitere Anteile vorhanden, die sich vor allem im niederfrequenten Bereich (10 Hz bis 200 Hz) befinden. Die als lokale Feldpotenziale (LFP, engl. *local field potential*) bezeichneten Anteile entstehen vor allem durch die synchrone Aktivität vieler Neuronen. Obwohl niedrige Frequenzanteile in einigen Anwendungen mit in die Analyse einfließen [32], beschränkt sich die Untersuchung von Aktionspotenzialen im Wesentlichen auf einen Frequenzbereich zwischen 300 Hz und 5 kHz.

Bringt man eine Metallelektrode in Kontakt mit Zellen, entsteht aufgrund der sie umgebenden Flüssigkeiten eine elektrisch isolierte Doppelschicht (ca. 5 nm), die sich für kleine Spannungen wie ein Kondensator verhält. Die Kapazität ist dabei von der Oberfläche und der Beschaffenheit der Elektrode abhängig. Typische Werte liegen im Bereich zwischen 150 nF und 1,5 pF.

Bereits beim Entwurf von Elektroden muss deshalb darauf geachtet werden, dass neben Material auch die Fläche einen Einfluss auf die Signalqualität besitzt. Kleinere Elektrodendurchmesser führen infolge höherer Impedanzen zu höheren Rauschpegeln [70]. Der Betrag des Elektrodenrauschens wird nach [71] im Wesentlichen durch ihre Bandbreite B in Hz und ihren Widerstand R in $M\Omega$ beeinflusst und wird bei Zimmertemperatur durch Gleichung 3.1 approximiert.

$$E = 0.1219\sqrt{R \times B}\mu V_{\text{rms}} \quad (3.1)$$

Erste Ergebnisse zur mehrfachen nichtinvasiven Langzeitableitung elektrischer Signale aus Zellen wurden von C. A. Thomas Jr. bereits 1972 [12] veröffentlicht. Der erste Prototyp bestand aus 30 Elektroden, die in zwei Reihen im Abstand von 100 μ m mittels Dünnschicht-Technologie auf einem Glasträger aufgedampft wurden. Die Elektrodenoberfläche beträgt rund 50 μm^2 , mit denen von Herzmuskelzellen Amplituden von 20 μ V bis 2,5 mV erzielt werden konnten. Die Elektroden bestehen aus vergoldetem Nickel, bei denen ein Polymer als Passivierungsschicht dient.

Gleichzeitig arbeitete eine Gruppe um Guenter W. Gross an einem ähnlichen System, bei dem vergoldete Titanelektroden eingesetzt wurden [13]. Die Elektroden besitzen eine Fläche von 12 \times 2 μm^2 , die auf einem Glasträger mit einer Fläche von 0,5 \times 1 mm^2 aufgebracht sind. Die Impedanz der Sensoren beträgt bei 1 kHz circa 4 $M\Omega$ für glatte sowie 2 $M\Omega$ für raue Sensoroberflächen. Bei einem

Rauschpegel von unter $20\ \mu\text{V}$ werden für große Zellen Signalstärken von bis zu $3\ \text{mV}$, bei mittleren Zellen ($40\ \mu\text{m}$ Durchmesser) bis etwa $400\ \mu\text{V}$ erreicht. Die Kapazität der Kopplung zwischen Metall und Elektrolyt erreicht etwa einen Wert von $0,5\ \text{pF}\ \mu\text{m}^{-2}$ [13–15, 72].

Ohne ein zentrales Nervensystem treten bei neuronalen Netzen *in vitro* kaum Aktivitäten auf. Deshalb sind künstliche Stimuli notwendig, die auf optische, chemische, mechanische oder elektrische Weise erfolgen können [35]. Bei elektrisch erregbaren Zellen bietet sich daher eine bidirektionale Kommunikation über die vorhandenen Sensoren an.

Im Jahr 1980 stellte Jerome Pine [16] erstmalig ein System aus 32 Elektroden vor, die gleichzeitig zur Stimulation und Signalableitung genutzt werden können. Die Elektroden aus Chrom und Gold besitzen eine Fläche von $8 \times 10\ \mu\text{m}^2$ und sind mittels Dünnschicht-Technologie auf einem Glasträger aufgebracht. Die Impedanz der Sensoren bei $1\ \text{kHz}$ beträgt $0,1$ bis $1\ \text{M}\Omega$, die Kapazität zwischen Elektrode und Medium ca. $20\ \text{pF}$.

Erst die Möglichkeit zur gleichzeitigen Signalableitung und Stimulation über die Elektroden führte zum Durchbruch der MEA-Technologie und ermöglichte weitere Anwendungsbereiche innerhalb der Grundlagenforschung [73–80]. Mit Hilfe von D/A-Wandlern können heute beliebige Muster erzeugt und an beliebiger Stelle auf die Zellen übertragen werden [81, 82].

In Tabelle 3.2 auf Seite 16 sind einige MEA-Entwicklungen zusammen mit wichtigen Eigenschaften und Parametern aufgelistet.

Als Trägermaterial für Elektroden ist Glas eines der meist verwendeten Materialien, aber auch Keramik, Silizium oder Leiterplattenmaterial können dafür verwendet werden. Die Sensor-Oberfläche wird mit einer Isolierschicht überzogen, die mehrere Funktionen erfüllen muss. Neben einer entsprechenden Biokompatibilität müssen auch gute Adhäsion und Stabilität gegenüber chemischen Substanzen gewährleistet werden [14]. Diese Eigenschaften werden in der Regel durch Siliziumdioxid (SiO_2), Titandioxid (TiO_2) oder Zirkondioxid (ZrO_2) erreicht [90, 91].

Eine Signalableitung kann aufgrund unterschiedlicher Ladungsträger in Zellen und Elektronik nur über elektrische Felder erfolgen und wird kapazitiv realisiert. Für die nichtinvasive kapazitive Ableitung haben sich zwei Konzepte etabliert: i) Metallkontakte auf Glas- oder Siliziumträger und ii) Feldeffekttransistoren (FET). Innerhalb der FETs können wiederum nichtmetallisierte und metallisierte Transistorgates unterschieden werden, die einerseits direkt mit dem Elektrolyt oder über isolierte *floating gates* an die Zelle gekoppelt sind [92, 93].

Bei den Metallkontakten haben sich vor allem Gold (Au) und Platin (Pt), aber auch Titanitrid (TiN) als Sensormaterial bewährt [12, 94]. Die elektrischen Verbindungen von Elektroden auf Glas-MEAs werden häufig mit Hilfe von Indium-Zinn-Oxid (ITO) realisiert, da es sich dabei um ein transparentes Material handelt und damit Lichtmikroskopie ermöglicht. Der charakteristische Durchmesser von Metall-Elektroden liegt im Bereich 10 bis $100\ \mu\text{m}$.

Tabelle 3.2 Planare Multielektroden-Arrays und ihre Eigenschaften.

Quelle	Jahr	Elektroden	Material		Impedanz	Amplitude [μ V]		Elektrode		
			Substrat	Sensor		Isolierung	Signal	Rauschen	Fläche [μm^2]	Abstand [μm]
[12] Thomas et al.	1972	2×15	Glas	Gold	Polymer	0,7 ± 0,5 M Ω	20–2500	—	7 × 7	50/100
[13] Gross et al.	1977	6×6	Glas	Gold	Polymer	3 ± 1 M Ω	400–3000	20	24	100/200
[16] Pine	1980	2×16	Glas	Gold	SiO ₂	0,5 ± 0,4 M Ω	30–100	2–20	8×10	250
[83] Novak et al.	1986	32	Glas	Gold	Pyralin	1,4 M Ω	8–40	5–15	981	200
[84] Regehr et al.	1989	61	Glas	ITO	PI	500 k Ω	20–3000	~6	230	70
[85] Connolly et al.	1990	8×8	—	Gold	Si ₃ N ₄	0,1 – 1 M Ω	100–400	—	100	—
[86] Nisch et al.	1994	60	SiO ₂	Gold	Si ₃ N ₄	400 ± 50 k Ω	—	—	157	—
[87] Oka et al.	1999	8×8	Glas	Gold	PI	6,21 ± 0,25 k Ω	—	2–3	60×60	150
[75] Jimbo et al.	2003	8×8	Glas	ITO	Si	100 k Ω	—	—	500	—
[23] Eversmann et al.	2003	128×128	Si	Si	—	—	100–5000	—	32	7,8
[88] Tooker et al.	2004	4×4	Si	Gold	Si ₃ N ₄	40 k Ω	15–75	—	1414	440
[89] Frey et al.	2009	11011	Si	Pt	SiO ₂ /Si ₃ N ₄	—	—	7–9	77	18

Bei der Verwendung von FETs als Sensor wird ein nicht-metallisiertes *Gate* kapazitiv an die Zelle angekoppelt [95–97]. Ein ausgelöstes Aktionspotenzial erzeugt eine Spannung, die über das *Gate* zu einem Unterschied im *Source-Drain*-Strom führt.

Ein weiterer Sensortyp wird in [93, 98, 99] vorgestellt, bei dem mit Hilfe einer *Floating gate*-Architektur ein n-Kanal-Transistor mit einer variablen Sensorfläche umgesetzt wurde. Dieses Konzept erlaubt die unabhängige Optimierung von Transistor und Sensorfläche. Im Vergleich zu nicht-metallisierten *Gate*-FETs werden bei der *Floating gate*-Architektur bessere Signal-Rauschverhältnisse erzielt. Weitere Untersuchungen sind in [92, 100–103] erläutert.

Um eine Ableitung von sehr vielen Zellen zu ermöglichen, sind Chips mit einer hohen Sensordichte notwendig. Typische Durchmesser von Neuronen liegen im Bereich zwischen 10 und 100 μm . Eine optimale Auflösung sollte deshalb ebenfalls in diesem Bereich angesiedelt sein. Obwohl diese Auflösungen theoretisch auch in Dünnschicht-Technologie realisierbar sind, wird eine praktische Umsetzung vor allem durch Halbleiterprozesse forciert [18].

Durch die sehr gute Beherrschbarkeit und Vielseitigkeit der CMOS-Technologie (CMOS, engl. *Complementary Metal Oxide Semiconductor*) können vielfältige Sensortypen auf einer Oberfläche kombiniert werden. Neben der Integration elektronischer Komponenten in Silizium [23, 91] sind auch andere Sensoren zur Temperaturbestimmung oder zur Erfassung von Stoffwechselfparametern möglich [104].

Max-Planck-Institut und Infineon (Gruppe um Fromherz, Eversmann, Thewes und Jenkner)

In [23] wird ein Sensorchip mit 128×128 Sensoren vorgestellt, mit dem mittels FET-Technologie Signale aus Neuronen abgeleitet werden. Aufgrund des großen Abstands zwischen Lipidmembran und Siliziumdioxid-Schicht können mit dieser Technologie jedoch nur geringe Signalpegel erzielt werden. Weitere Entwicklungen und Untersuchungen zur FET-Technologie als Sensor sind in [5, 66–68, 90–92, 105–110] zu finden.

Universität Rostock (Gruppe um Baumann, Wolf und Lehmann)

Ein weiteres siliziumbasiertes MEA-System wurde an der Universität Rostock von der Gruppe Baumann, Wolf und Lehmann entwickelt [111]. Es beinhaltet neben einer Sensor-Matrix aus 8×8 Sensoren zur Ableitung elektrophysiologischer Signale ebenfalls pH-Sensoren (ISFET, engl. *Ion Sensitive Field Effect Transistor*), Sensoren zur Bestimmung von Zellanzahl, Adhäsion und Zellmorphologie (IDES, engl. *interdigitated electrode structures*) sowie Temperatursensoren, die mittels CMOS-Prozess integriert wurden. Mit dieser Sensoranordnung ist es möglich, mehrere Parameter und Eigenschaften eines neuronalen Netzes gleichzeitig zu analysieren. Eine genauere Vorstellung dieses Systems erfolgt in Anhang A sowie in [112–117].

EPFL Lausanne (Gruppe um Imfeld, Berdondini und Maccione)

An der Ecole Polytechnique Fédérale de Lausanne (EPFL, Schweiz) wurde von der Gruppe Imfeld, Berdondini und Maccione ein APS-MEA (engl. *Active Pixel Sensor*) mit 64×64 aktiven Elektroden entwickelt [118]. Die einzelnen Elektroden besitzen eine Größe von $21 \mu\text{m} \times 21 \mu\text{m}$ und sind auf einer Fläche von $2,67 \times 2,67 \text{ mm}^2$ angeordnet. Die erreichbaren Signalpegel liegen im Bereich von $100 \mu\text{V}$ bis 2 mV , bei Rauschpegeln zwischen $11 \mu\text{V}$ (statisch) und $26 \mu\text{V}$ (dynamisch). Neben dem APS-MEA wird ein komplettes System aus notwendigen Hard- und Softwarekomponenten angeboten [18, 119–125].

ETH Zürich (Gruppe um Hierlemann, Heer und Frey)

Ein weiteres System bestehend aus 1024 Elektroden mit jeweils einem Durchmesser von $40 \times 40 \mu\text{m}$ wird in [126] beschrieben. Die Elektroden sind unabhängig voneinander adressierbar und können über Multiplexer zur Signalableitung und Stimulation genutzt werden. Auf dem Chip befinden sich neben Verstärkern zusätzliche analoge Komponenten, die zur Signalvorverarbeitung eingesetzt werden. Weitere Parameter und Eigenschaften sind in [127–129] dokumentiert.

In [81] wird ein auf CMOS-Technologie basiertes Mikroelektroden-Array mit 128 Elektroden auf einer Chipfläche von $6,5 \times 6,5 \text{ mm}^2$ für die bidirektionale Kommunikation mit Zellmaterial vorgestellt. Der Chip beinhaltet analoge Verstärker, D/A- und A/D-Wandler für die Stimulation sowie zur Digitalisierung der abgeleiteten Signale, Temperatursensoren und eine digitale Schnittstelle für den Datenaustausch. Die integrierten Verstärkerstufen ermöglichen eine Auswahl einer 1000- oder 3000fachen Verstärkung. Die abgeleiteten Signale werden mit einer Frequenz von 20 kHz und einer Auflösung von 8 bit digitalisiert. Bei Neuronen werden Signalstärken von ca. $600 \mu\text{V}$, bei Kardiomyozyten ca. $1,3 \text{ mV}$ erreicht.

Eine der jüngsten Sensorchip-Entwicklungen an der Eidgenössischen Technischen Hochschule (ETH Zürich, Schweiz) um Hierlemann, Heer und Frey werden in [89] vorgestellt. Dabei handelt es sich um einen Chip mit 11011 bidirektionalen Metall-Elektroden, von denen beliebig 126 zur Stimulation und Signalableitung ausgewählt werden können. Der Durchmesser einer Elektrode beträgt $7 \mu\text{m}$, die jeweils im Abstand von $18 \mu\text{m}$ als Wabenmuster auf einer Fläche von $2,0 \times 1,75 \text{ mm}^2$ ($3150 \text{ Elektroden/mm}^2$) platziert sind. Der Rauschpegel konnte durch eine spezielle Passivierung auf $7 \mu\text{V}$ bis $9 \mu\text{V}$ reduziert werden. Weitere Informationen sind in [81, 126–133] zu finden.

Neben Metall- und Halbleiterelektroden werden jüngst auch weitere Werkstoffe zur Sensorherstellung untersucht, mit denen bessere Signaleigenschaften realisiert werden können. Vor allem Kohlenstoff scheint hierbei ein geeignetes Material zu sein. In [134] erfolgt die Untersuchung eines Sensorsystems auf Basis von Diamanten. In [135–140] erfolgt die Beschreibung von Sensoren aus sog. Kohlenstoff-Nanoröhrchen (CNT, engl. *carbon nano tubes*). Speziell für die Verbindung mit biologischem Material besitzen CNT gute Eigenschaften und könnten eine neue Sensor-Generation bilden.

Obwohl die Verwendung planarer Sensor-Arrays eine Verbesserung hinsichtlich der Signalableitung aus Zellnetzwerken darstellt, werden bei dieser Technologie deutliche Abstriche bei der Verbindung zwischen Zelle und Sensor in Kauf genommen. Verschiedene Ansätze versuchen daher, durch Oberflächenmodifikation und neue Sensorgeometrien gezieltere Verbindung zwischen Zellen und Sensoren aufzubauen.

Zur Ableitung elektrischer Signale sowie für die Stimulation von Zellen werden Elektroden mit geringer Impedanz benötigt. Mit kleiner werdenden Sensor-Oberflächen steigt jedoch die Impedanz, so dass mit zusätzlichen Beschichtungen eine Reduzierung erreicht werden muss. Unterschiedliche Materialien wurden bisher dafür verwendet, darunter Poly-D-Lysin, Laminin, Titanitrid (TiN), Iridiumoxid (IrOx) und Platinum Black (Pt black) [118, 126, 141, 142].

Die Position von Neuronen auf einem MEA können bisher nur in geringen Maßen beeinflusst werden. Das hat den Nachteil, dass unter ungünstigen Bedingungen Neuronen keinen direkten Kontakt zu Sensoren haben. Deshalb wird versucht, durch mechanische Barrieren [143], chemische Substanzen [144] oder genetische Veränderungen [67] Neuronen an gewünschte Stellen zu lenken bzw. dort zu fixieren.

In [52, 53, 88, 145, 146] wird ein Ansatz vorgestellt, bei dem Neuronen mit Hilfe sog. *Neurocages* sensor-nah fixiert werden können. Die Käfige bestehen aus dreidimensionalen Polymer-Strukturen (Parylene) und können in einem fotolithographischen Prozess erstellt werden. Ein einzelner Käfig besteht aus einem Ring mit einem Durchmesser von 30 μm und einer Höhe von etwa 9 μm . Innerhalb des Rings befindet sich eine 10 μm -Elektrode. Zusätzlich sind in jedem Käfig 6 Tunnel vorhanden, um Verbindungen über Dendriten mit anderen Neuronen zu ermöglichen.

Mit den vorhandenen planaren Sensorarchitekturen können momentan nur Messungen in der Ebene durchgeführt werden. Ein sehr vielversprechender Ansatz mit sog. Mikronadeln (engl. *micro needles*) weicht von diesem Konzept ab [32, 147–154]. Die Elektroden sind dabei als nadelförmige Spitzen ausgeführt. Neben einer hohen räumlichen Auflösung [155] lassen sich durch Variation der Nadellänge zudem räumliche Messungen realisieren [31].

Eine Weiterentwicklung von Mikronadel-Elektroden mit zusätzlichen Vertiefungen, bei denen durch Unterdruck eine Fixierung von Zellen erzielt wird, ermöglicht die Anwendung von *Patch Clamp*-Techniken auf Mikrostrukturebene. Durch Variation des Anpressdrucks kann der Kontakt zwischen Zelle und Sensor gesteuert werden [156].

Neben der technologischen Weiterentwicklung der Sensorik stehen auch andere Aspekte im Vordergrund, die auf eine höhere Automatisierung von Versuchsabläufen mit Multielektroden-Arrays abzielen. Des Weiteren sollen durch die zusätzliche Integration von Systemen, deren Anbindung bisher lediglich extern erfolgte, neue Einsatzgebiete erschlossen werden. Hierfür soll beispielhaft die Integration von Mikrofluidik-Systemen [133, 157] oder integrierte Sensor-Arrays in den Wells auf Mikrotiterplatten [158, 159] genannt werden.

Tabelle 3.3 Kommerziell erhältliche Multielektroden-Arrays und ihre Eigenschaften.

System	Hersteller	Elektroden	Träger	Impedanz [k Ω bei 1 kHz]	Rauschpegel [μ V]
MEA60 100 Au	Ayanda	Gold	Glas	1000–1300	25–30
MEA60 100 Pt	Ayanda	Platin	Glas	800–1100	20–25
MEA60 200 Au	Ayanda	Gold	Glas	600–800	25–30
MEA60 200 Pt	Ayanda	Platin	Glas	400–600	20–25
MEA60 200 ITO	Ayanda	ITO	Glas	1000–1200	30–40
100/10-Ti	MCS	TiN	Glas	30–400	10–20
200/10-ITO	MCS	ITO	Glas	30–400	10–20
3D-MEA	MCS	Platin	—	—	—
EcoMEA	MCS	Gold	PCB	30	10–20
MED64	Panasonic	ITO + Pt black	Glas	7–10	2–3

Im kommerziellen Umfeld sind derzeit vor allem Systeme auf Glasbasis mit unterschiedlichen Metall-Elektroden verfügbar. Für spezielle Messanordnungen sind bei den Herstellern eine Reihe unterschiedlicher Sensor-Konfigurationen (Anzahl, Material, Durchmesser, Abstand) erhältlich. Tabelle 3.3 auf Seite 20 liefert einen Auszug über kommerziell verfügbare Sensorsysteme. In Europa bieten dabei vor allem Ayanda Biosystems SA (Schweiz) und MultiChannelSystems GmbH (Deutschland), in Japan Alpha MED Sciences (vormals Panasonic) sowie Plexon Inc. in den USA vollständige Systemlösungen an. Diese beinhalten die analoge und digitale Signalaufbereitung und -auswertung, die Stimulation und Mikromanipulation sowie notwendige Softwarekomponenten zur Ansteuerung der Hardware bis hin zur Weiterverarbeitung und Archivierung der abgeleiteten Signale.

Neben der Signalableitung werden Komponenten zur analogen Signalaufbereitung sowie zur Digitalisierung der abgeleiteten Signale benötigt. Neben kommerziellen Produkten, bspw. von Plexon Inc., werden in vielen Fällen eigene Komponenten zur analogen Vorverarbeitung und Digitalisierung entwickelt.

Am Israel Institute of Technology wurde ein analoges Frontend in Form eines integrierten Schaltkreises entworfen, das analoge Verstärker- und Filterfunktionen sowie die Digitalisierung in CMOS realisiert und speziell an die besonderen Eigenschaften neuronaler Signale angepasst wurde. Universelle Schnittstellen erlauben die Anbindung unterschiedlicher MEA-Typen sowie die Parametrierung der Verstärker und Filterstufen [160–164].

3.2 Signalvorverarbeitung

Bei der Ableitung neuronaler Signale durch planare Elektroden kommt es aufgrund der Kontaktart von Zelle und Sensor zur Überlagerung unerwünschter Störsignale und einzelner Zellsignale. Für die Auswertung der Signale müssen diese vom Rauschen befreit und Aktionspotenziale individueller

Zellen mit einem Zeitstempel versehen werden. Die dafür notwendigen Arbeitsschritte wurden bereits in Kapitel 2 ausführlich beschrieben.

Lewicki (1998) [56] liefert einen ersten Überblick über die Arbeitsschritte, die notwendig sind, wenn Signale von planaren Elektroden ausgewertet werden müssen. Darüber hinaus erfolgt eine Bestandsaufnahme über den aktuellen Stand von Technik und Wissenschaft der genutzten Verfahren und Algorithmen.

Die nachfolgenden Abschnitte ergänzen aktuelle Neu- und Weiterentwicklungen der einzelnen Teilbereiche.

3.2.1 Filterung

Generell sei bei der Filterung von Signalen biologischen Ursprungs angemerkt, dass aufgrund des bislang unbekanntes Rauschmodells keine allgemein gültige Filtermethode entwickelt werden konnte. Die in diesem Signal enthaltenen Störanteile sind von einer Vielzahl von Faktoren abhängig, die unter anderem das verwendete Sensormaterial, die Art der Kopplung zwischen Zelle und Sensor, die analogen Signalverarbeitungskomponenten, das eingesetzte Zellenmaterial sowie die physikalischen Eigenschaften der Zellumgebung beinhalten. Dabei treten sowohl stationäre als auch instationäre Störanteile auf, wobei stationäre Anteile durch einfache Filteroperationen beseitigt werden können. Deutlich aufwändiger gestaltet sich die Reduzierung instationärer Anteile.

Die einzelnen instationären Störanteile setzen sich im Wesentlichen aus drei Komponenten zusammen: i) dem sog. Kanalrauschen [165], das durch Ionen-Kanäle in den Zellen entsteht; ii) durch biologisches Rauschen [166], das durch Hintergrundaktivität entfernter Zellen verursacht wird; und iii) durch thermisches Rauschen [71, 167], das durch ohmsche Komponenten elektronischer Bauteile hervorgerufen wird.

Generell können vorhandene Filteransätze in zwei Gruppen unterteilt werden. Die erste Gruppe beinhaltet Methoden, die Signale im Zeitbereich filtern und zu denen alle klassischen analogen und digitalen Varianten der FIR- und IIR-Filter zählen. Während diese aufgrund fehlender Alternativen hauptsächlich in den Anfängen der Signalauswertung neuronaler Signale eingesetzt wurden, finden FIR-Filter aktuell nur noch in der Bereinigung statischer Störfrequenzanteile Anwendung [123, 168]. Ein wesentlicher Nachteil von statischen FIR- und IIR-Filtern gegenüber neueren (adaptiven und wavelet-basierten) Methoden liegt in der höheren Verzerrung der Signale [169].

Die zweite Gruppe verwendet neuere Ansätze der Signalzerlegung und ermöglicht damit bessere adaptive Rauschunterdrückungsmethoden, die vor allem beim Auftreten von biologisch erzeugten Signalschwankungen und Temperaturschwankungen Vorteile mit sich bringen [170]. Dieser Mehrwert erfordert jedoch meist einen höheren Berechnungsaufwand, bietet aber bessere zeitliche und

spektrale Auflösungen. Die aktuellen Entwicklungen in Richtung Mehrkernprozessoren sowie die Verwendung von Grafikkarten (GPU, engl. *Graphics Processing Unit*) zur parallelen Datenverarbeitung könnten diesen Mehraufwand ausgleichen und zudem neue Ansätze ermöglichen [171, 172]. Weitere Erläuterungen dazu sind in Abschnitt 3.5 zu finden.

Bei den adaptiven Filtern konnte sich innerhalb dieses Anwendungsbereiches vor allem die Wavelet-Transformation durchsetzen. Die Grundlage dafür bilden sog. Basis-Wavelets $\psi(t)$, die aus endlichen und bandbegrenzten Signalen bestehen [173]. Durch gestreckte ($s > 1$) und gestauchte ($s < 1, s \neq 0$) Varianten können unterschiedliche Frequenzen analysiert und durch den Verschiebungsparameter τ zeitlich lokalisiert werden.

$$\psi_{s,\tau}(t) = \frac{1}{\sqrt{s}} \psi\left(\frac{t-\tau}{s}\right) \quad (3.2)$$

Durch Faltung von $\psi_{s,\tau}$ mit einem Signal $x(t)$ entstehen komplexe Wavelet-Koeffizienten \underline{C} (Gleichung 3.3), die analog zur Korrelation die Ähnlichkeit zwischen Wavelet und Signal darstellen und durch τ und s sowohl Frequenz- als auch Ortsangaben liefern [174]. Bei Verwendung orthogonaler Basis-Wavelets können Wavelet-Koeffizienten wieder nahezu verlustfrei invertiert werden [175, 176].

$$\underline{C}(s, \tau) = \frac{1}{\sqrt{s}} \int_{-\infty}^{\infty} x(t) \psi^*\left(\frac{t-\tau}{s}\right) dt \quad (3.3)$$

Für die kontinuierliche Wavelet-Transformation (CWT) wird eine nahezu unendliche Anzahl skaliertes und verschobener Wavelets generiert, die für eine numerische Umsetzung ungeeignet sind und zudem eine hohe Redundanz aufweisen. Da über das Abtasttheorem nach Nyquist und Shannon [177] bei digitalen Signalen ohnehin eine maximale Auflösung in Bezug auf Frequenz und Zeit existiert, kann Gleichung 3.3 als diskrete Wavelet-Transformation (DWT) formuliert werden [178–180], wobei sich eine zeitliche und spektrale Diskretisierung durch $2^m \Delta\tau$ und $s_m = 2^m$ mit $m \geq 0$ ergibt (Gleichung 3.4).

$$\underline{C}(m, n) = 2^{-m/2} \sum_{k=-\infty}^{\infty} x(k) \psi^*(2^{-m}k - n) \quad (3.4)$$

Die diskrete Wavelet-Transformation führt zu einer Trennung des Signals $x(t)$ in einen Hoch- und Tiefpassanteil, wobei die Grenzfrequenz f_c in etwa einem Viertel der Abtastfrequenz entspricht ($f_c \approx f_s/4$). Durch Kaskadierung lassen sich auf diese Weise Filterbänke konstruieren, mit denen durch Manipulation einzelner Koeffizienten unterschiedliche Filteroperationen (u.a. Kantenerkennung und *Denoising*) realisiert werden können [178, 181].

Das von Donoho (1995) [170] vorgestellte Verfahren (*VisuShrink*) basiert auf einer mehrstufigen Wavelet-Zerlegung [182] eines Signals $x(t)$ in unterschiedliche Frequenzbänder und nutzt ausgewählte Wavelet-Koeffizienten c_i zur Abschätzung der Streuung σ_{noise} der Störsignalanteile. Dieser Wert kann zur Berechnung einer universellen Schwelle T_{noise} genutzt werden, der als Grundlage zur Modifikation entsprechender Wavelet-Koeffizienten dient.

Nach [170] kann eine Abschätzung des Schwellwerts relativ einfach über die Standardabweichung der Störsignalanteile σ_{noise} sowie der Anzahl N im Signal enthaltenen Abtastwerte bestimmt werden.

$$T_{\text{noise}} = \sigma_{\text{noise}} \sqrt{2 \ln(N)} \quad (3.5)$$

Bei sehr geringen Signalrauschabständen, wie sie bei der Ableitung neuronaler Signale häufiger der Fall sind, wird in [183] eine modifizierte Variante für die Schwellwertberechnung vorgeschlagen (Gleichung 3.6). Im Gegensatz zur universellen Variante können damit auch Signalanteile berücksichtigt werden, die aufgrund ihrer geringen Signalpegel sehr nah am Störbereich liegen.

$$T_{\text{noise}} = \sigma_{\text{noise}} (0.3936 + 0.1829 \log_2(N)) \quad (3.6)$$

Beim waveletbasierten *Denoising* wird davon ausgegangen, dass breitbandige Störanteile gleichmäßig auf alle Frequenzbänder verteilt sind und sich damit additiv auf alle Wavelet-Koeffizienten verteilen. Eine Abschätzung der Störsignale erfolgt anhand Gleichung 3.7 mit geeigneten Koeffizienten c_i .

$$\sigma_{\text{noise}} = \frac{\text{median}(|c_i|)}{0.6745} \quad (3.7)$$

Weitere Schätzverfahren zur Bestimmung von Störsignalanteilen σ_{noise} auf Basis von Wavelet-Koeffizienten sind unter anderem in [184] zu finden.

Für die Auswahl geeigneter Koeffizienten c_i existieren generell zwei unterschiedliche Verfahrenswesen:

- i) Bestimmung von σ_{noise} aus einem einzelnen Koeffizientenband c_i , in dem überwiegend Störsignale vorhanden sind. Dieser Wert dient zur Modifikation aller Detailbänder.
- ii) Bestimmung von σ_{noise} aus allen Koeffizientenbändern und Anwendung eines individuellen Schwellwertes für jedes Detailband.

Die Auswahl eines oder mehrerer Frequenzbänder hängt dabei von der Art des Rauschens und der Anzahl der Dekompositionsstufen der Wavelet-Transformation ab. Besteht ein einzelnes Frequenzband vorwiegend aus Störsignalen, so kann eine gute Abschätzung für das Gesamtsignal erfolgen.

Die Modifikation der Frequenzbänder erfolgt anschließend mit Hilfe zweier Verfahren, die auf Basis von σ_{noise} unerwünschte Signalanteile reduzieren.

Bei der Verwendung einer harten Schwelle (engl. *hard threshold*) werden nur Koeffizienten unmodifiziert beibehalten, deren Betrag mindestens dem geschätzten Rauschanteil T_{noise} entspricht. Liegt der Betrag von T_{noise} unter dem von c_i , kann angenommen werden, dass durch den entsprechenden Koeffizienten lediglich ein Störanteil abgebildet wird. Dieser Koeffizient kann dementsprechend auf Null gesetzt werden (Gleichung 3.8).

$$D_{\text{hard}}(c, T_{\text{noise}}) = \begin{cases} c & \text{für alle } |c| \geq T_{\text{noise}} \\ 0 & \text{sonst} \end{cases} \quad (3.8)$$

Bei der Verwendung einer weichen Schwelle (engl. *soft threshold*) wird die ursprüngliche Annahme, dass Störanteile breitbandig in allen Koeffizienten vorhanden sind, besser berücksichtigt. Anhand Gleichung 3.9 wird der Wert der einzelnen Koeffizienten c_i betragsmäßig um T_{noise} verkleinert, sofern c_i den Wert von T_{noise} übersteigt. Lediglich Koeffizienten mit einem kleineren Wert können, analog Gleichung 3.8, auf Null gesetzt werden.

$$D_{\text{soft}}(c, T_{\text{noise}}) = \begin{cases} c - T_{\text{noise}} & \text{für alle } c \geq T_{\text{noise}} \\ c + T_{\text{noise}} & \text{für alle } c < -T_{\text{noise}} \\ 0 & \text{sonst} \end{cases} \quad (3.9)$$

Obwohl dieses Verfahren ursprünglich zur Entstörung von Bildern entwickelt wurde (deshalb auch die Bezeichnung *VisuShrink*) [185, 186], erzielt es bei der Filterung neuronaler Signale im Vergleich zu klassischen Verfahren bessere Ergebnisse [169]. Zahlreiche Modifikationen der Grundidee ermöglichen weitere Einsatzgebiete [186–198].

Ein vollständiger Filtervorgang auf Basis von Wavelets erfolgt nach folgendem Schema:

1. Zerlegung eines Signals $x(t)$ unter Verwendung eines geeigneten Basis-Wavelets in eine entsprechende Anzahl von Frequenzbändern.
2. Eine Abschätzung der Störsignalanteile σ_{noise} erfolgt anhand Gleichung 3.7.
3. Mit Hilfe von Gleichung 3.5 oder Gleichung 3.6 wird der Schwellwert T_{noise} bestimmt.
4. Modifikation der Detailband-Koeffizienten cD_x anhand von T_{noise} (Gleichung 3.8 oder 3.9).
5. Löschen der Approximationsband-Koeffizienten zur Entfernung des Gleichanteils (*Detrending*).
6. Inverse Transformation der modifizierten Koeffizienten in ein Zeitsignal.

Einen wesentlichen Einfluss auf die Qualität des Filters hat die Wahl des Basis-Wavelets. Je nach Anwendung können verschiedene Basis-Wavelets unterschiedliche Eigenschaften im Signal hervorheben, da sie besser mit einer entsprechenden Zielfrequenz korrelieren.

Für Filtervorgänge neuronaler Signale wurden bisher hauptsächlich Basis-Wavelets aus der Daubechies-, Symlet- und Coiflet-Familie sowie biorthogonale Wavelets eingesetzt [199–202], da diese besonders gut mit Aktionspotenzialen korrelieren. Ausführliche Untersuchungen, ob und welchen Einfluss die verschiedenen Basis-Wavelets auf die Qualität des Filterprozesses haben, wurden in der Literatur bisher nicht gefunden.

Die Auswahl eines geeigneten Wavelets orientiert sich meist anhand der Zielfrequenz und den zu analysierenden Signaleigenschaften. Ein optimales Filterergebnis aufgrund eines Wavelets wird aber nur bei stationärem weißem Rauschen erzielt [170]. In [203] stellen die Autoren deshalb ein Verfahren vor, bei dem ein Wavelet anhand eines Qualitätskriteriums in einem iterativen Prozess optimiert werden kann und sie können nachweisen, dass die Qualität der Entstörung hauptsächlich durch die Wahl eines geeigneten Wavelets geprägt ist.

In [169] erfolgt ein direkter Vergleich der waveletbasierten Filtermethode und einem klassischen Butterworth-Filter. Aufgrund der geringeren Signalverzerrung bei der waveletbasierten Methode ist eine bessere Clusterbildung erkennbar. Es konnte sogar durch Verringerung von sieben auf sechs Filterstufen eine Zunahme des Signalrauschabstandes nachgewiesen werden.

Um größeren Signalverzerrungen infolge von Filterprozessen entgegenzuwirken, empfiehlt [204] eine entsprechende Analyse der Impedanzen des gesamten Signalweges bis zu ersten Filterstufe. Diese Werte sollen genutzt werden, um auftretende Phasenverschiebungen mit Hilfe der anschließenden analogen sowie digitalen Filterstufen zu korrigieren.

In [205] wird ein anderes interessantes Konzept zur Entfernung von Störsignalen vorgestellt, bei dem erstmalig Informationen von benachbarten Sensoren, die auf einem Array angeordnet sind, genutzt werden. Aufgrund ihrer Distanz werden neurophysiologische Signale jeweils nur von einem einzelnen Sensor erfasst. Die abgeleiteten Signale der umliegenden Sensoren bilden die sog. virtuelle Referenz, deren Mittelwert vom Testsensor subtrahiert wird. Damit lassen sich vor allem global auftretende Störeinflüsse reduzieren, die von mehreren Sensoren erfasst werden.

3.2.2 Signaldetektion

Die zuverlässige Erkennung von Spikes im abgeleiteten Signal ist Voraussetzung für die weitere Verarbeitung. Können Spikes beispielsweise aufgrund von starken Hintergrundaktivitäten über einen längeren Zeitpunkt nicht erkannt werden, kann dies Auswirkungen auf die Analyse von Aktivitätsmustern haben.

Nachfolgend werden die wichtigsten Methoden zur Erkennung von Spikes vorgestellt und bewertet.

Eine der einfachsten Erkennungsmethoden ist die Festlegung eines fixen Amplitudenwertes, der bei Überschreitung einen Signalausschnitt extrahiert. Implementierungen können in analoger Schaltungstechnik [71, 206] sowie mit Hilfe digitaler Verfahren [207] realisiert werden. Eine zusätzliche Vorverarbeitung ist hierbei nicht vorgesehen, weshalb dieses Verfahren bei schlechten Signal-Rauschverhältnissen deutliche Schwächen aufweist.

Digitale Verfahren bieten aufgrund der Verwendung weiterer Signalmerkmale eine sichere Spikererkennung, selbst bei wechselnden Signaleigenschaften. In [208] wird neben lokalen Mini- und Maxima zusätzlich der Anstieg betrachtet, so dass eine bessere Unterscheidung zwischen echten Aktionspotenzialen und Rauschspitzen erfolgt.

Obwohl diese sehr einfach implementiert werden können, wirken sich fixe Schwellwerte bei instationären Rauschverhältnissen nachteilig aus. In Bereichen mit geringen Signalrauschabständen kann es daher zu einer hohen Anzahl von *false positives* (FP) oder *false negatives* (FN) kommen. Digitale Verfahren in Verbindung mit komplexeren Algorithmen ermöglichen die Verwendung variabler Schwellwerte, die aus geschätzten Rauschmodellen gewonnen werden.

Wird zur Entstörung des Signals ein Wavelet-basiertes Verfahren verwendet, kann der bereits errechnete Wert σ_{noise} aus Gleichung 3.7 als Triggerschwelle für Aktionspotenziale genutzt werden. In [168, 170, 209] erfolgt eine Erkennung anhand des vierfachen Wertes von σ_{noise} .

$$T_{\text{spike}} = 4\sigma_{\text{noise}} \quad (3.10)$$

Ähnliche Detektionsmethoden auf Basis adaptiver Schwellwerte sind in [56, 207, 209–213] zu finden.

Ein sehr einfach zu implementierendes Konzept basiert auf der Bestimmung der Energie sehr kurzer Signalabschnitte und wird als *Teager Energy Operator* (TEO) bzw. *Nonlinear Energy Operator* (NEO) bezeichnet [214, 215]. Das durch Gleichung 3.11 beschriebene Verfahren verwendet dabei lediglich drei Abtastwerte, die allerdings ausreichend sind, um Störanteile durch ihren Mittelwert zu reduzieren.

$$E(n) = x^2(n) - x(n-1)x(n+1). \quad (3.11)$$

Trotz der einfachen Berechnungsvorschrift besitzt der Algorithmus sehr gute Eigenschaften in Bezug auf breitbandige sowie energiereiche Rauschsignalanteile und erfordert keinerlei Kenntnisse der Signaleigenschaften.

In Vergleichen [70] mit sehr geringen Signalrauschabständen wurden bessere Ergebnisse erzielt als mit anderen adaptiven Verfahren. Die Erkennungsrate bei einem Signalrauschabstand (SNR) von

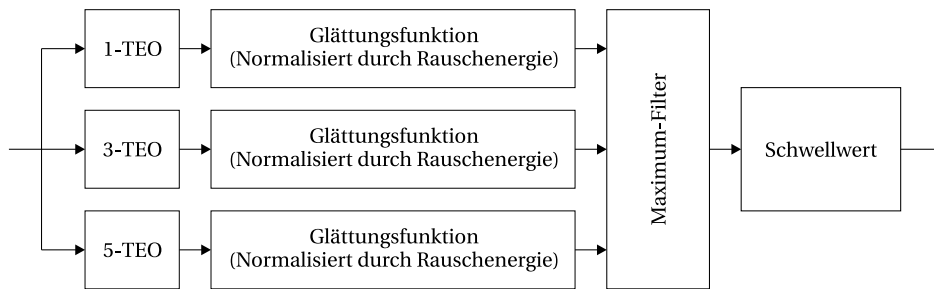


Abbildung 3.2 Schematische Darstellung des MTEO-Verfahrens.

1.2 (0.8 dB) liegt über 90%. Durch den geringen Berechnungsaufwand kann dieses Verfahren zudem sehr gut als Echtzeiterkennung in Mehrkanalsystemen verwendet werden.

In [216] stellen die Autoren fest, dass TEO sehr sensitiv auf Störanteile reagiert, sofern die Frequenzen des Rauschanteils geringer als die der Aktionspotenziale sind. Deshalb erfolgt in Gleichung 3.12 eine Erweiterung auf k -TEO durch Hinzufügen des Auflösungsparameters k .

$$E(n) = x^2(n) - x(n - k)x(n + k) \quad (3.12)$$

Durch Parallelschaltung mehrerer k -TEO-Verfahren (vgl. Abbildung 3.2) erfolgt die Erweiterung zum *multi-resolution* TEO (MTEO). Damit können Aktionspotenziale unterschiedlicher Frequenzen besser erfasst werden [217]. Die Glättungsfunktion wird mit Hilfe des *Hamming*-Fensters [218] realisiert.

Eine weitere Möglichkeit zur Erkennung von Spikes bieten die kontinuierliche [200, 219] und diskrete [202, 220–222] Wavelet-Transformation. Für die Erkennung werden Basis-Wavelets gewählt, deren Form ähnlich der von Aktionspotenzialen ist und die demzufolge sehr gut mit entsprechenden Wavelets korrelieren. Im Gegensatz zu Rauschsignalanteilen entstehen so an Stellen mit Aktionspotenzialen große Wavelet-Koeffizienten, die zur Detektion und Lokalisation genutzt werden können [223]. Einzelne Frequenzbänder können dabei auch kombiniert werden [224], um die Erkennungswahrscheinlichkeit weiter zu erhöhen.

Obwohl morphologische Filter ursprünglich für die Bildverarbeitung und -analyse [225–227] entwickelt wurden, werden sie zunehmend auch für eindimensionale Signale in biomedizinischen Anwendungen eingesetzt [228–231]. Die zwei Grundoperationen werden als *Opening* und *Closing* bezeichnet. *Erosion* und *Dilation* sind jeweils zusammengesetzte Operationen aus *Opening* und *Closing*.

- Bei der *Dilation* wird ein Signal $f(n)$ entsprechend einem Strukturelement g erweitert.

$$(f \oplus g^s)(n) = \max \{f(\tau) + g(-(n - \tau))\}$$

- Die *Erosion* ist die (quasi-)inverse Operation zur *Dilation*, bei der ein Signal $f(n)$ um das Strukturelement g verkleinert wird.

$$(f \ominus g^s)(n) = \min \{f(\tau) - g(-(n - \tau))\}$$

- Beim *Opening* wird eine Erosion mit einer anschließenden Dilation desselben Strukturelements g durchgeführt.

$$(f \circ g)(n) = [(f \ominus g^s) \oplus g](n)$$

- Die umgekehrte Operationsreihenfolge des *Opening* wird als *Closing* bezeichnet.

$$(f \bullet g)(n) = [(f \oplus g^s) \ominus g](n)$$

Ein morphologisches Filter dient dabei der Hervorhebung ausgewählter Signalausschnitte, wobei das eigentliche Signal verfälscht wird. Bei Signalen, die sowohl Aktionspotenziale als auch Störanteile mit ähnlichen Amplituden beinhalten, werden unter Verwendung der Grundelemente Signalanteile von sehr kurzer Dauer (Störanteile) reduziert, so dass Signalanteile von längerer Dauer (Aktionspotenziale) hervorgehoben werden.

In [229, 232, 233] wird ein sog. *Peak valley extractor* (PVE) genutzt, um Rauschanteile zu minimieren und Aktionspotenziale hervorzuheben (vgl. Gleichung 3.13). Als Strukturelement g wird ein *Hamming*-Fenster (Gleichung 3.14) verwendet, wobei A und N entsprechend Abtastfrequenz und Spikelänge gewählt werden können. Anschließend erfolgt eine Spikeerkennung mittels fixer Schwelle.

$$\text{PVE}(n) = f(n) - \frac{1}{2} [f \circ g] \quad (3.13)$$

$$g(n) = A \left(0.54 - 0.46 \cos \frac{2\pi n}{N} \right) \quad (3.14)$$

In [232] werden sieben verschiedene Verfahren zur Spikeerkennung untersucht, darunter eine waveletbasierte [219], eine morphologische, eine *template*-basierte [212] und eine energiebasierte [70] Erkennungsmethode. Anhand künstlicher Datensätze mit unterschiedlichen Rauscheigenschaften erzielt sowohl bei schlechter als auch guter SNR die morphologische Filtermethode die beste Erkennungsrate, gefolgt von der waveletbasierten und energiebasierten. Mit gleichem Ergebnis erfolgt in [229] ein Vergleich von waveletbasierter und morphologischer Spikeerkennung in EEG-Signalen.

Weitere Möglichkeiten zur Erkennung von Spikes bieten die Hauptkomponentenanalyse [234–236], neuronale Verfahren [237] sowie *Template matching*-Verfahren [238].

Eine Möglichkeit zur Validierung erkannter Spikes wird in [205] vorgestellt. Bei der sog. *inter-electrode correlation* (IEC) werden extrahierte Spikes mit simultan auftretenden Signalausschnitten aus benachbarten Sensoren eines Arrays verglichen. Ergibt sich anhand dieser Signalausschnitte ein hoher Korrelationsfaktor, kann davon ausgegangen werden, dass es sich um einen sog. *false positive* aufgrund einer Rauschspitze handelt, die von mehreren umliegenden Sensoren erfasst wurde.

Nach der Extraktion eines Spikes erfolgt normalerweise die Merkmalsreduktion. Für eine erfolgreiche Bestimmung der Merkmale ist es jedoch erforderlich, die extrahierten Signale an einem gemeinsamen Punkt geometrisch auszurichten. Je nach Abtastrate kann deshalb eine Erhöhung der Abtastwerte mittels Interpolation (*Curve fitting*, *Cubic spline*) zu einer genaueren Ausrichtung (engl. *alignment*) führen [239, 240]. Anhand praktischer Untersuchungen [168, 241] konnte nachgewiesen werden, dass sich durch diesen zusätzlichen Schritt die Klassifikationsgenauigkeit erhöhen lässt.

Mit Skalierung ist die Anpassung der Signalamplituden gemeint. Diese verfolgt die Idee, dass kleine Spikes in einem Signal in ihrer Amplitude angehoben werden. Obwohl dies generell zur Verfälschung von Merkmalen und damit zur Fehlklassifizierung führen kann, mag dieser Schritt in einigen Fällen zu besseren Ergebnissen führen.

Beim Auftreten sog. *Bursts*, bei denen Zellen einer kontinuierlichen Reizung ausgesetzt sind, kommt es aufgrund der zu kurzen Regenerationsphase zur Reduzierung der Signalamplituden. Aufgrund der veränderten Eigenschaften kann es daher zur Fehlklassifizierung dieser Signale kommen.

Mit Hilfe geeigneter Verfahren zur Ermittlung solcher reduzierter Signale sowie der anschließenden Skalierung kann damit eine zuverlässigere Klassifizierung erzielt werden.

Bei lebenden neuronalen Zellnetzwerken führen instationäre Prozesse zu „Phänomenen“, die bei der Generierung künstlicher Sensordaten selten Berücksichtigung finden und deshalb beim Entwurf von Auswerteverfahren oft vernachlässigt werden. Dabei handelt es sich um i) die Überlagerung von Spikes, ii) *Bursts* sowie iii) Elektrodendrift.

Zur Überlagerung von Spikes kommt es bei einer (nahezu) synchronen Ableitung zweier oder mehrerer Aktionspotenziale über ein und denselben Sensor. Die auftretenden Signale können zwar von einem Detektionsalgorithmus erkannt werden, werden aber normalerweise aufgrund der unbekanntem Signalzusammensetzung verworfen. In der Literatur wurden bisher nur sehr wenige Ansätze für die Trennung in Einzelsignale veröffentlicht, da sich ein Mehraufwand in der Regel nicht lohnt.

In [242] wird eine entsprechende Lösung vorgestellt, bei der die bereits vorhandenen *Templates* in unterschiedlicher Weise miteinander kombiniert werden und abgeleitete Signale mit den resultierenden Signalgemischen verglichen werden. Bei einer hohen Korrelation können so die

Einzel-signalkomponenten ermittelt werden. Ähnliche Verfahrensweisen sind in [51] und [243] zu finden.

Bursts treten auf, wenn Zellen einer kontinuierlichen Reizung ausgesetzt sind und aufgrund einer zu kurzen Regenerationszeit nicht mehr ihre ursprüngliche Signalamplitude erreichen. Die resultierenden Aktionspotenziale unterliegen deshalb Amplitudenschwankungen und können, sofern sie eine bestimmte Detektionsschwelle erreichen, zu Fehlklassifizierung führen.

Unter Berücksichtigung der minimalen Regenerationszeit (ISI, engl. *inter-spike intervall*) können *Spikes*, die diesen Wert unterschreiten, durch eine Skalierung auf ihre ursprüngliche Amplitude vergrößert werden.

Eine sog. Elektrodendrift kann bei Wachstums- oder Alterungsprozessen oder durch die Zufuhr von Flüssigkeiten auf einem Sensorarray auftreten, bei denen es zu Ortsveränderungen von Neuronen in Bezug auf einzelne Sensoren kommt. In diesen Fällen kommt es zu Unstetigkeiten im abgeleiteten Signal. Betrachtet man die Eigenschaften abgeleiteter Signale über einen längeren Zeitraum, kann es durch hohe Varianzen zur Überlappung oder zum Verschwinden einzelner Cluster kommen.

In [244–246] werden dazu Lösungsvorschläge vorgestellt, die im Wesentlichen Verfahren zur Änderungsbestimmung von Signaleigenschaften sowie der kontinuierlichen Anpassung von *Templates* beinhalten.

3.3 Merkmalsextraktion

Nachdem Aktionspotenziale im Signal erkannt und extrahiert wurden, muss die Bestimmung der am Signalgemisch beteiligten Neuronen (Quellen) erfolgen. Durch die unterschiedliche Lage von Neuronen zu einem Sensor entstehen leicht modifizierte Signalformen. Anhand der Unterschiede in der Signalform lässt sich somit die Anzahl der über diese Elektrode abgeleiteten Aktionspotenziale bestimmen. Die Merkmalsextraktion (engl. *feature extraction*) verfolgt innerhalb des *Spike sorting* generell zwei wesentliche Punkte [247]:

- **Datenreduktion** bei der Speicherung relevanter Informationen, sowie
- **Dimensionsreduktion** zur Verringerung der Datenmenge und damit die Erhöhung der Performance.

Mit der Extraktion der Signalausschnitte, in denen Aktionspotenziale vorkommen können, findet bereits eine wesentliche Datenreduktion statt. Dennoch befinden sich innerhalb extrahierter Signale hohe Redundanzen, die mit Hilfe geeigneter Filter weiter reduziert werden können. Eine große Anzahl vorhandener Verfahren [247] ermöglicht es, die unterschiedlichsten Merkmale zu extrahieren. Es hat sich jedoch gezeigt, dass mit wachsender Anzahl von Merkmalen keinesfalls die Clustergenauigkeit erhöht werden kann, ganz im Gegenteil. Bei verschiedenen Anwendungen

wurde deutlich [248], dass die Verwendung der ersten zwei oder drei Merkmale am Besten zur Separation einzelner Cluster geeignet sind.

Ein kritischer Aspekt ist die Bewertung der gefundenen bzw. extrahierten Merkmale. Hier stellt sich im Besonderen die Frage: Wie kann man entscheiden, dass es sich um ein Merkmal handelt und nicht um einen quasiperiodischen Rauschanteil? Und welche statistischen Möglichkeiten sind vorhanden, um festzulegen, wie oft ein Merkmal auftreten muss, bevor man es auch tatsächlich als Merkmal einstuft und für die weitere Verwendung berechnet? Treten beispielsweise einige Spikeformen nur sehr sporadisch auf, können diese schnell vernachlässigt werden.

Als Modellvorstellung bestehen Neuronen aus einer punktförmigen Quelle, aus der Aktionspotenziale emittiert werden [249]. In der Realität werden neuronale Aktivitäten aber vom gesamten Zellkörper absorbiert. Extrazellulär abgeleitete Signale werden durch Rückwirkungen ausgesendeter Signale sowie von anderen zustands- und verhaltensabhängigen Veränderungen des Membranpotenzials beeinflusst. Infolgedessen können von ein und demselben Neuron Signale mit sehr großer Varianz erzeugt werden.

Die Hauptkomponentenanalyse (PCA, engl. *principal component analysis*) stellt eine der wichtigsten Verfahren der Merkmalsextraktion dar und ermöglicht die Reduktion eines Vektors auf Basis einer orthogonalen Linearkombination. Die einzelnen Hauptkomponenten werden anhand ihrer Varianz der Größe nach sortiert und bieten gemessen am quadratischen mittleren Fehler die beste Variante zur Merkmalsextraktion [250]. In zahlreichen Anwendungen wird die PCA zur Merkmalsextraktion eingesetzt [206, 239, 251–253]. Eine Extraktion von Merkmalen in Echtzeit ist mit der klassischen Variante nicht möglich.

Eine weitere Möglichkeit der Verwendung von Wavelet-Koeffizienten zur Erkennung von Aktionspotenzialen bietet die Lilliefors-Modifikation des Kolmogorov-Smirnov-Tests (KS-Test). In [168] wird nach einer analogen Filterung (Butterworth-Filter) eine vierstufige Waveletterlegung mittels Haar-Wavelet durchgeführt. Mit Hilfe des KS-Tests [254] wird die Abweichung der Koeffizienten $F(x)$ von der gaußschen Normalverteilung $G(x)$ bestimmt, unter der Prämisse, dass jeweils Koeffizienten mit einer großen Abweichung der Norm einem Aktionspotenzial zugeordnet werden können (Gleichung 3.15). Besitzen Koeffizienten zusätzlich eine hohe Varianz, so kann es sich um verschiedene Aktionspotenziale handeln. Die zehn Koeffizienten mit der größten Abweichung werden als Merkmalsvektor für den Clusteralgorithmus verwendet.

$$\max(|F(x) - G(x)|) \quad (3.15)$$

Ein in [168] durchgeführter Vergleich zur Extraktion von Merkmalen durch eine PCA und einen KS-Test belegt, dass mittels KS-Test bessere Merkmale extrahiert werden können, die sich in einer geometrischen Darstellung deutlicher voneinander unterscheiden.

In [255] werden mit Hilfe einer diskreten Wavelet-Transformation (DWT) sog. Wavelet-Features extrahiert, die unter Verwendung verschiedener neuronaler Netze zur Merkmalsextraktion gewonnen werden. In [247] erfolgt die Extraktion von Merkmalen mit einem Bayes'schen Netzwerk. Eine schnellere Variante basiert auf einer Supportvektor-Maschine (SVM, engl. *support vector machine*), die aufgrund einer höheren Robustheit gegenüber Rauschanteilen, einer schnelleren Konvergenz sowie weniger Berechnungsaufwand eine bessere Performance besitzt [256].

Weitere Verfahren zur Merkmalsextraktion sind die Hauptkoordinatenanalyse (engl. *principle coordinate analysis*) [257], die nichtlineare Hauptkomponentenanalyse (engl. *nonlinear principal component analysis*) [258] sowie die *Independent Component Analysis* [54, 259–266].

3.4 Clusteranalyse

Die Aktionspotenziale aus einer unbekanntem Anzahl von Neuronen, die über eine Elektrode abgeleitet werden, wurden in den vorherigen Verarbeitungsschritten detektiert und extrahiert. Aufgrund ihrer unterschiedlichen Lage zum Sensor besitzen sie verschiedene Signaleigenschaften, die mittels Merkmalsextraktion aus den Signalformen bestimmt werden. Unter der Annahme, dass sich die Signaleigenschaften eines Aktionspotenzials aus einem Neuron in kurzen Abständen nur minimal ändern, verweisen gleiche bzw. sehr ähnliche Merkmale auf den Ursprung aus ein- und demselben Neuron. Mit Hilfe der Clusteranalyse lassen sich nun aus den extrahierten Merkmalen die Anzahl der Neuronen (Quellen) auf einem Sensor bestimmen.

Die Clusteranalyse umfasst unterschiedliche Methoden zur Gruppierung von Daten mit ähnlichen Eigenschaften. Sie kommt dann zum Einsatz, wenn individuelle Eigenschaften oder Merkmale für die Auswertung von Signalen nicht von direktem Interesse sind. Im wesentlichen unterscheiden sich Signale in einer Gruppe nur sehr geringfügig (meist durch überlagertes Rauschen verursacht). Verschiedene Gruppen bzw. Cluster sollten allerdings sehr wenige Ähnlichkeiten aufweisen.

Ein geeigneter Clusteralgorithmus muss die Struktur multidimensionaler Muster aus unmarkierten Stichproben anhand der vorher extrahierten Merkmale erkennen. Betrachtet man beispielsweise drei Merkmale mit der größten Varianz und bildet diese in einem dreidimensionalen Koordinatensystem ab, sollten für Aktionspotenziale mit gleichen Eigenschaften Anhäufungen entstehen, deren Anzahl, Position und Varianz mit Hilfe eines geeigneten Clusterverfahrens bestimmbar sind.

Die Aufgabe des Klassifikators ist die Einordnung eines Objekts in eine Kategorie anhand extrahierter Merkmale [267]. Objekte mit ähnlichen Eigenschaften bilden daher im abgebildeten Merkmalsraum Anhäufungen (engl. *Cluster*), so dass unter bestimmten Voraussetzungen die Anzahl der Neuronen, die auf eine Elektrode einwirken, direkt ablesbar wird. Durch verschiedenartige

Rauschanteile entstehen bei der Darstellung der Merkmale Streuungen, die zur Überlappung einzelner Cluster führen können und somit keine klaren Grenzen darstellen.

Sind bereits Informationen über Anzahl und Position der Cluster bekannt, ist eine Abgrenzung der Cluster mit Hilfe von Abstandsmetriken möglich. Nimmt die Varianz der Stichproben innerhalb eines Clusters (Intracustervarianz) kleinere Beträge an als die Varianz zweier Cluster (Intercluster-varianz), ist eine Unterscheidung meist problemlos möglich.

Sind aber umgekehrt kaum Informationen über zu erwartende Stichproben bekannt, können Clusteralgorithmen zu sehr schlechten oder falschen Ergebnissen führen. Anstatt Strukturen innerhalb von Daten zu ermitteln, werden Stichproben beliebigen Strukturen zugeordnet.

Voraussetzung für Clusteralgorithmen bei einem automatischen *Spike sorting* ist, dass sie möglichst unüberwacht arbeiten. Das bedeutet, dass für die Bestimmung von einzelnen Clustern kein Trainingsdatensatz erforderlich ist. Deshalb müssen mögliche Verfahren iterativ anhand bestimmter Kriterien eine eindeutige Lösung finden.

Das Problem bei der Merkmalsextraktion besteht darin, dass viele Komponenten nicht exakt mathematisch beschreibbar sind. Sie liefern daher bei der manuellen Suche zum Teil wesentlich bessere Ergebnisse. Dies ist besonders dann der Fall, wenn das zu untersuchende Signal von einem hohen Rauschanteil überlagert wird.

Eines der ältesten Verfahren zur Bestimmung ähnlicher Signale ist das *Template Matching* (TM) [268–270]. *Templates* bilden dabei einen typischen Signalverlauf eines Clusters ab. Unbekannte Signalanteile werden mit den bereits vorhandenen *Templates* verglichen und anhand ihrer Korrelation oder mit Hilfe der Summe der mittleren quadratischen Abweichung (RMSE, engl. *root mean squared error*) einem Cluster zugeordnet.

$$\text{RMSE} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (x_i - \hat{x}_i)^2 \quad (3.16)$$

Voraussetzung für eine erfolgreiche Einordnung der Signale ist allerdings, dass alle im Signal vorkommenden Kurvenformen als *Template* vorliegen [206].

Beim adaptiven *Template Matching* werden unbekannte Aktionspotenziale mit vorhandenen *Templates* verglichen. Korrelieren die vorhandenen Signalformen nicht mit einem neuen, unbekanntem Signal, bildet dieses Signal ein neues *Template* [199].

Der *k*-Means Clusteralgorithmus [271] ist einer der am häufigsten verwendeten und einfachsten Verfahren zur Gruppierung von Datensätzen und wurde des öfteren bereits beim *Spike sorting* verwendet [56, 272–277]. Dabei werden *n* Objekte auf eine vorher festgelegte Anzahl *k* an Clustern *c_i* derart verteilt, dass deren Abstand ein Minimum zum nächstgelegenen Clustermittelpunkt μ_i annimmt (vgl. Gleichung 3.17). Der Mittelpunkt eines Clusters μ_i wird in einem iterativen Verfahren

(vgl. Gleichung 3.18) aus den Datenpunkten x_j eines Clusters bestimmt und beschreibt in der Regel seinen Schwerpunkt.

$$c_i = \operatorname{argmin} \sum_{i=1}^k \sum_{x_j \in c_i} \|x_j - \mu_i\|^2 \quad (3.17)$$

$$\mu_i = \sum_j^n x_j \quad \text{mit } x_j \in c_i \quad (3.18)$$

Problematisch wirkt sich jedoch beim k -Means die Festlegung der maximalen Anzahl k an Clustern aus, die beim *Spike sorting* generell unbekannt sind. Damit werden alle Datenpunkte auf die vorher festgelegten Cluster verteilt, was zu falschen Ergebnissen führen kann.

Der Algorithmus ordnet Datenpunkte x_i entsprechend eines Kriteriums J , das meist auf einer Abstandsmetrik basiert, einem Clustercenter μ_i zu. Da es sich jedoch meist um lineare Kriterien handelt, erfolgt die Zuordnung immer nur zu einem Cluster. Andererseits ist der maximale Abstand zu einem Clustercenter μ_i linear, so dass Clustergrenzen anhand der entsprechenden Dimension festgelegt werden (kreisförmig für \mathbb{R}^2 sowie kugelförmig für \mathbb{R}^3).

Ausgehend vom k -Means wurden modifizierte Versionen entwickelt, die unter anderem eine Stichprobe mehreren Clustern zuordnen können (sog. *fuzzy k-Means*). Außerdem ist mit Hilfe zusätzlicher Parameter u_{ij}^r eine entfernungsabhängig gewichtete Clusterzuordnung (*hybrid k-Means*) möglich [278, 279].

$$c_i = \sum_{i=1}^k \sum_{j=1}^n u_{ij}^r \|x_j - \mu_i\|^2 \quad (3.19)$$

Obwohl k -Means zu den unüberwachten Clusterverfahren zählt, ist bei den klassischen Varianten eine Festlegung der genauen Anzahl k der Cluster *a priori* erforderlich. Eine Einordnung der Stichproben erfolgt immer entsprechend der Vorgabe von k , auch wenn die in dem Datensatz vorkommenden Klassen eine andere natürliche Zuordnung besitzen.

Möchte man k -Means dennoch als Clusterverfahren anwenden, existieren zwei alternative Ansätze [267]. Der erste Ansatz beruht darauf, dass man das zu klassifizierende Problem mit einer unterschiedlichen Anzahl k berechnet. Anhand eines Kriteriums wird festgestellt, für welches k valide bzw. natürliche Cluster gefunden werden. Der zweite Ansatz basiert auf einem Schwellwert, der festlegt, in welcher maximalen Entfernung Stichproben in ein bereits vorhandenes Cluster fallen, bevor ein neues Cluster erzeugt wird.

Neuronale Netze

Cluster werden mit Hilfe von neuronalen Netzen gefunden. Ohne Modifikation bzw. zusätzliche Kriterien sind neuronale Netze nicht in der Lage, selbständig die Anzahl der Cluster zu ermitteln.

Eine sehr einfache Methode zum Auffinden von Clustern wird in [280, 281] vorgestellt. Einem neuronalen Netz, bestehend aus drei Schichten sowie 32 Eingängen, werden digitalisierte Werte eines extrahierten Spikes direkt zugeführt. Um die korrekte Anzahl an Clustern zu erzielen, müssen dem Netz diese Cluster vorher mit Hilfe eines Trainingsvektors angelernt werden. In [282] wird eine Methode vorgestellt, um neuronale Netze iterativ an sich ändernde Aktionspotenziale anzupassen.

Das in [210] vorgestellte Verfahren basiert ebenfalls auf einem dreischichtigen neuronalem Netz, dem die Abtastwerte direkt zugeführt werden. Mit Hilfe von Vektoren, die sowohl alle im Signal vorkommenden *Templates* sowie verschiedene additive Rauschanteile beinhalten, erfolgt das Training des Netzes. Bei einem anschließenden Vergleich mit dem *Template Matching*-Verfahren erzielt das neuronale Netz bessere Ergebnisse. Selbst bei überlagerten Signalen, die innerhalb der Trainingsvektoren nicht vorhanden waren, konnten im Vergleich zum *Template*-Verfahren bessere Ergebnisse erreicht werden.

Ein neuronales Netz auf Basis eines Bayes'schen Klassifikators wird in [283–285] beschrieben. Ein Vergleich mit herkömmlichen Methoden (*Template Matching* sowie Hauptkomponentenanalyse) zeigt, dass das neuronale Netz eine nahezu (99%) korrekte Klassifizierung erzielt, wobei *Template Matching* (96%) und Hauptkomponentenanalyse (95%) geringer ausfallen.

In [251] erfolgt die Untersuchung eines Kohonen-Netzwerks zur Clusteranalyse, bei dem die Anzahl der zu erwartenden Cluster vorgegeben werden muss. Die Autoren wählen die maximale Anzahl, die mit einer Elektrode zu erwarten ist und führen anschließend eine zusätzliche Analyse hinsichtlich der Dichte durch, um gleiche Cluster zusammenzufassen.

Weitere Verfahren auf Basis neuronaler Netze werden in [70] (Radial Basis Function Network, RBFN), [286] (Support Vector Machines, SVM) und [287, 288] (Self-Organizing Maps, SOM) untersucht.

Ein von [289, 290] vorgestellter Clusteralgorithmus basiert auf den physikalischen Eigenschaften eines inhomogenen ferromagnetischen Modells und wurde von [168] zum Clustern von Spikedaten untersucht. Das als superparamagnetischer Clusteralgorithmus bezeichnete Verfahren (Gleichung 3.20) verwendet dabei die Interaktionsstärke J_{ij} zwischen ausgewählten Merkmalen eines Spikevektors x_i und seines nächstgelegenen Nachbarn x_j , wobei K die Anzahl der nächsten Nachbarn und a die durchschnittliche Distanz zwischen den Nachbarn darstellt [291].

$$J_{ij} = \begin{cases} \frac{1}{K} \exp\left(-\frac{\|x_i - x_j\|^2}{2a^2}\right) & \text{falls } x_i = \min\left(\|x_i - x_j\|^2\right) \\ 0 & \text{sonst} \end{cases} \quad (3.20)$$

Ordnet man ausgewählte Eigenschaften in einem zweidimensionalen Raum, entstehen für Signale mit gleichen Eigenschaften so genannte Cluster. Durch instationäre Eigenschaften überlappen

sich diese Cluster, sofern sie über einen großen Zeitraum beobachtet werden. Sortieralgorithmen werden dadurch erheblich erschwert.

Die meisten Algorithmen berücksichtigen keine zeitlichen Informationen und gehen von rein stationären Signalen aus, deren Eigenschaften während einer Messung konstant bleiben. Verwendet man Messwerte von lebenden Zellen, werden die Grenzen der bisher vorgestellten Algorithmen meist sehr schnell deutlich. Die gefundenen Cluster überlappen sich und unterschiedliche Signalformen werden dem gleichen Cluster zugeordnet. Verwendet man die zeitlichen Informationen, um aus instationären relativ stationäre Signale zu formen, sollte eine bessere Trennung der Cluster auch über einen längeren Zeitraum gelingen [292].

3.5 Parallelisierung von Algorithmen

Aus den bisherigen Erfahrungen scheint sicher, dass kein triviales Verfahren existiert, die mittels planarer Elektrode abgeleiteten Informationen auszuwerten. Um den Schritt von der manuellen zur automatisierten Auswertung zu ermöglichen, sind aufwändige Verfahren notwendig, die vor allem hohe Rechenkapazitäten benötigen. Die Zunahme von Sensoren, deren Signale gleichzeitig ausgewertet werden sollen, führt weiterhin zu einer Zunahme der notwendigen Rechenkapazitäten.

Aktuelle Entwicklungen informationsverarbeitender Systeme unterstützen diesen Trend. Eine weitere Erhöhung der Taktgeschwindigkeit der CPU führt vor allem zu sehr hohen Blindleistungen, die in Form von Wärme nicht mehr aus der CPU abgeleitet werden können. Deshalb erfolgt momentan eine Skalierung an Rechenkernen auf einer CPU, um durch eine parallele Verarbeitung von Daten höhere Geschwindigkeiten zu erzielen.

Dieser Trend wurde analog von den Herstellern von Grafikkarten (GPUs) verfolgt. Immer leistungsfähigere Spiele haben zur Entwicklung von Grafikkarten geführt, die realitätsnahe und hochaufgelöste Grafiken nur mit Hilfe paralleler Verarbeitung erreichen konnten. Durch die Bereitstellung von Schnittstellen können die hochparallelen Rechenkern für wissenschaftliche Berechnungen genutzt werden.

Voraussetzung zur Nutzung der Leistungsfähigkeit von Grafikkarten als auch Mehrkern-CPU-Systemen sind jedoch Algorithmen, die sich parallelisieren lassen.

Im Bereich des *Spike sortings* wurden diese Algorithmen bisher kaum untersucht und sind auch nicht Gegenstand der eigenen Untersuchungen. Lediglich der Vollständigkeit halber werden erste parallele Ansätze der oben genannten Algorithmen und Verfahren aufgezählt:

- Wavelet-Transformation: [293–303];
- Merkmalsextraktion: [304]
- Clusterverfahren: [305–307]

- Neuronale Netze [300, 308]

3.6 Datenaustausch

Fehlende Standards auf der einen Seite und proprietäre Systeme kommerzieller Hersteller auf der anderen Seite haben zu einer Reihe von unterschiedlichen Speicherformaten geführt. Dies betrifft sowohl Rohdaten als auch bereits sortierte Signale. Um neue *Spike sorting*-Verfahren mit einer möglichst großen Auswahl unterschiedlicher Daten von verschiedenen Systemen zu validieren, ist jeweils ein hoher Aufwand beim Import von Daten notwendig.

Um dennoch einen einfachen Datenaustausch zu ermöglichen, wurde *NeuroShare* entwickelt. *NeuroShare* [309] ist eine Bibliothek, die auf der einen Seite eine Anbindung an unterschiedliche Datenformate über ein- und dieselben Funktionen ermöglicht. Auf der anderen Seite können Entwickler proprietärer Datenformate mit Hilfe einer *Dynamic Link Library* (DLLs) ihre eigenen Datenformate einbinden und müssen somit keine Quellen öffnen.

Gleichzeitig versucht *NeuroShare* durch ein eigenes Datenformat einen Standard zu schaffen. Obwohl dies der erste Versuch zur Standardisierung eines Datenformats für neurophysiologische Daten darstellt und die API bereits in verschiedenen kommerziellen als auch frei verfügbaren Produkten eingesetzt wird, existiert bislang lediglich eine Version für windowsbasierte Rechner. Die aktuelle Version sowie weiterführende Dokumentationen sind unter <http://neuroshare.sourceforge.net> erhältlich.

3.7 Methoden zur Validierung

Die Bewertung der Ergebnisse, die durch das *Spikes sorting* ermittelt werden, stellt eine der größten Herausforderungen dar. Hauptaufgabe dabei ist es, die Qualität der verwendeten Algorithmen zu ermitteln sowie Aussagen zu treffen, inwiefern die extrahierten *Spikes* der richtigen *Unit* zugeordnet wurden. Dafür existieren zwei unterschiedliche Verfahren: Das erste Verfahren basiert auf der manuellen Auswertung realer Signale und den Vergleich mittels automatisch extrahierter Aktionspotenziale.

Das zweite Verfahren basiert auf der Verwendung künstlich erzeugter Signale. Aufgrund der bekannten Parameter in künstlich erzeugten Signalen wie Signalrauschabstand (SNR), Anzahl verwendeter *Units* sowie deren exakter *Timestamp* kann eine bessere Validierung mit den automatisch extrahierten *Spikes* erfolgen. Für einen objektiven Vergleich sind hierfür realitätsnahe künstliche Signale erforderlich, die zum einen die individuellen Eigenschaften eines Sensorarrays abbilden und zum anderen in einem universellen (und möglichst standardisiertem) Datenformat vorliegen.

Eine große Algorithmenanzahl kann nur an simulierten Daten getestet werden, da bisher kaum Datenbanken mit realen Signalen existieren. Dadurch wird ein objektiver Vergleich unterschiedlicher Algorithmen verhindert und die Weiterentwicklung von nutzbaren Algorithmen nur langsam vorangetrieben.

Das Projekt *Code Analysis, Repository & Modelling for E-Neuroscience*, kurz CARMEN [310], hat zum Ziel, gemeinsame Schnittstellen für den Austausch von Daten zu definieren und zur Verfügung zu stellen. Darüber hinaus soll eine Datenbank mit real abgeleiteten Signalen aufgebaut werden, die einen direkten Vergleich und den Austausch verschiedener Verarbeitungsverfahren ermöglicht.

Eine weitere Möglichkeit der Validierung besteht in der gleichzeitigen internen und externen Ableitung von Signalen über passive Sensoren und *Patch clamps*. Obwohl dieses Verfahren mit einem hohen Aufwand verbunden ist, können extern abgeleitete Aktionspotenziale mit intern abgeleiteten direkt verglichen werden [59, 311].

Weiterhin ist eine Validierung möglich, indem man reale Daten verwendet, deren Signale bereits manuell eindeutig erkannt und klassifiziert wurden und die mit zusätzlichen künstlichen Rauschsignalen überlagert werden. Das Rauschsignal kann dabei künstlich mit einem biophysikalischen Modell und einer Modellierung mittels *AutoRegressive-Moving Average* (ARMA) erzeugt werden. Weiterhin können verrauschte Signalausschnitte mit wenig oder keinen Spikesignalen verwendet werden [232].

Softwarepakete zur Simulation einzelner oder in Netzwerken organisierter Neuronen existieren seit einigen Jahren [312] und werden durch neue Erkenntnisse ständig erweitert. Besonders erwähnenswert sind dabei GENESIS [313] und NEURON [314]. Beide haben ihren Ursprung in der neurophysiologischen Forschung und basieren auf unterschiedlichen mathematischen und physikalischen Modellen. Im Wesentlichen erzeugen diese Simulationen Signale, wie sie im Inneren einer Nervenzelle entstehen. Durch geeignete Ersatzschaltungen aus der Leitungstheorie können Signalübertragungswege zwischen Neuronen simuliert werden [313]. Vergleiche der Simulationen mit praktischen Anwendungen konnten sehr gute Übereinstimmungen von mathematischer Theorie und biochemischer Praxis nachweisen [312].

Obwohl NEURON und GENESIS gute Möglichkeiten zur Simulation neuronaler Zusammenhänge bieten, wurden sie hauptsächlich für Neurowissenschaftler entworfen, um chemische Zusammenhänge zu analysieren. Für die Erzeugung von simulierten Signalen für das *Spike sorting* sind beide Softwarepakete nur bedingt geeignet. Die ausgegebenen Signale werden theoretisch immer innerhalb der Zelle gemessen und isoliert betrachtet.

Die Darstellung korrelierter Signale aus mehreren Neuronen, mit unterschiedlichen Abständen zum Sensor und verschiedenen Rauschquellen ist bisher nicht möglich.

Der für MATLAB erhältliche *Noisy Spike Generator* [315, 316] ermöglicht die Erstellung simulierter Signale durch Definition unterschiedlicher Signalparameter. So ist es möglich, Signale mit einer festgelegten Anzahl korrelierter und unkorrelierter Aktionspotenziale mit verschiedenen Rauscheigenschaften zu generieren, deren Zeitstempel konstant bleibt. Nachteilig beim *Noisy Spike Generator* ist, dass lediglich Signale eines einzelnen Sensors simuliert werden können und damit eine umfangreiche Simulation von Multielektroden-Arrays unmöglich erscheint. Für eine realistischere Simulation kann zusätzlich korreliertes Rauschen aus umliegenden Signalquellen hinzugefügt werden und damit ansatzweise zumindest ein neuronales Netzwerk simuliert werden.

Das Softwarepaket *Statistical sIMulation Of Neuronal networks Engine* (SIMONE) [317] bietet die Möglichkeit, künstliche Signale zu generieren, die über ein MEA abgeleitet wurden. Neben der Konfiguration der Signaleigenschaften (Verteilung der Neuronen auf MEA, Rauscheigenschaften, etc.) können genauso MEA-Eigenschaften wie Anzahl, Größe, Abstand sowie die elektrischen Eigenschaften der Sensoren parametrisiert und simuliert werden; inklusive Elektrodenverhalten, Störsignale, Alterungsprozesse, Sensitivität der Sensoren, extrazelluläres Rauschen sowie Position der Elektroden. Damit bietet SIMONE umfangreiche Test- und Analysemöglichkeiten für komplexe Algorithmen, die sich nicht darauf beschränken, einzelne Sensorsignale auszuwerten.

3.8 Zusammenfassung und vorläufige Bewertung

Die Multielektroden-Technologie wurde vor über 30 Jahren eingeführt und seitdem kontinuierlich verbessert. Dass es sich dabei um den richtigen Weg handelt, konnte bereits durch zahlreiche Anwendungen bestätigt werden [60, 318]. Sowohl die Auswahl an unterschiedlichen Sensoren als auch die höhere Integrationsdichte durch die Verwendung von CMOS-Prozessen haben zu großen Fortschritten bei der MEA-Entwicklung geführt. Zusätzlich bringt die Verwendung von CMOS-Technologie den Vorteil, dass analoge und digitale Komponenten in unmittelbarer Sensornähe integriert werden können und somit lange Signalwege entfallen.

Dennoch findet die Technologie kaum den Weg aus Laboren in reale Anwendungen. Die Gründe dafür sind vor allem in der noch mangelhaften Signalqualität sowie in fehlenden Teilbereichen bei der automatischen Signalverarbeitung zu suchen.

Sowohl mit der Dünnschicht- als auch Halbleitertechnologie werden bereits sehr gute Ergebnisse bei der Herstellung von kleinen Sensoren mit geringem Abstand ($<100\ \mu\text{m}$) auf kleinstem Raum erzielt. Für eine optimale Signalableitung wird eine räumliche Auflösung von etwa $10\ \mu\text{m}$ erwartet [5]. Begrenzt wird diese Auflösung in der Praxis momentan durch die sehr schlechten Signal-Rauschabstände, die infolge der hohen Impedanzen bei sehr kleinen Strukturbreiten auftreten. Die Impedanz einer Elektrode ist von ihrer Größe abhängig und steigt mit kleiner werdenden Sen-

sorradien [61]. Eine Optimierung durch unterschiedliche Sensormaterialien und Beschichtungen konnte bisher nicht im gewünschten Umfang erzielt werden.

Aufgrund der unterschiedlichen Ladungsträger kann eine Signalableitung mit MEAs vorwiegend kapazitiv erfolgen. Notwendige Passivierungsschichten mit Schichtdicken von ca. 15 nm, aber auch Glia-Zellen zwischen Zelle und Sensor, führen momentan noch zu einem zu großen Abstand (>50 nm) und damit zu hohen Widerständen, die im Vergleich zur Signalableitung mittels *Patch-Clamps* nur geringe Signalpegel ermöglichen [90].

Die Anzahl an Neuronen, die gleichzeitig überwacht werden können, ist mit der vorhandenen Technologie ebenfalls noch deutlich zu klein. Lediglich die Ansätze von [23] und [118] zielen in die richtige Richtung. Jedoch wird aufgrund problematischer Signal-Rauschabstände die Entwicklung von [23] nicht mehr verfolgt. Beim neuentwickelten APS-Array scheinen diese Probleme nicht mehr aufzutreten [118, 119]. Neuere Ergebnisse dazu sind bisher nicht bekannt.

Mit einer neuen Generation von Sensorarrays wird versucht, die Nachteile von planaren Elektroden zu umgehen. Mikronadel-Arrays, die über Halbleiterprozesse auf Siliziumträger aufgebracht werden, sind eine Mischung aus *Patch clamps* und Multielektroden-Array-Technologie. Durch ihre spitze Sensorgeometrie sollen sie einen besseren Kontakt zwischen Zelle und Sensor ermöglichen. Damit könnten Zellen sehr genau kontaktiert werden und würden weniger Rauschsignalanteile ableiten. Durch eine poröse Struktur, in der ein Unterdruck erzeugt wird, können Zellen an die Sensoren angesaugt werden, wodurch sich der Abstand zwischen Zelle und Sensor weiter verringern lässt. Weiterhin ist denkbar, dass sich damit Sensoren unterschiedlicher Höhe herstellen lassen und so Messungen im dreidimensionalen Raum möglich werden.

Das geringe Verhältnis zwischen Signal- und Rauschanteil, dessen Ursache in zu hohen Sensorimpedanzen liegt, ist einer der Hauptgründe, weshalb bisher kein vollständig automatisiertes Verfahren für das *Spike sorting* existiert [94]. Ansatzweise automatisierte Verfahren bieten nicht die notwendigen statistischen Sicherheiten bei der Signalauswertung, weshalb in vielen Fällen eine manuelle Auswertung notwendig ist. Dies führt zum einen dazu, dass kommerzielle Mikroelektroden-Arrays bislang selten mehr als 64 Sensoren besitzen und zum anderen, dass die Motivation zur Herstellung hochauflösender Sensor-Arrays stagniert. Ohne eine vollständig automatisierte Lösung, sowohl bei der zuverlässigen Verbindung zwischen Zelle und Sensor, als auch der Signalauswertung, werden viele MEA-basierte Anwendungen kaum den Prototypenstatus verlassen [319].

Viele verschiedene Algorithmen wurden bisher zur Separation von *Units* entwickelt und untersucht. Nur wenige davon ermöglichen den universellen Einsatz über ein breites Spektrum an unterschiedlichen Signalquellen. Wendet man verschiedene Verfahren auf einen identischen Datensatz an, erhält man sehr unterschiedliche Ergebnisse. Dies zeigt zum einen die Komplexität der Aufgabe und bestätigt zum anderen, dass immer noch kein ausreichendes Verständnis zur Vielfältigkeit der abgeleiteten Signale vorhanden ist. Jedes Verfahren basiert auf anderen Annahmen, Voraussetzungen

und Parametern. Die Vielzahl eigens entwickelter Sensor-Arrays und sich ständig ändernde Experimentierumgebungen; dazu die stochastische Verteilung von Neuronen auf einem Array erzeugen kaum reproduzierbare Ausgangsbedingungen. Eine Generalisierung des *Spike sorting*-Problems scheint daher fast aussichtslos.

Die größte Herausforderung bleibt die Validierung der Ergebnisse, die mit einem entsprechenden Verfahren aus den abgeleiteten Daten gewonnen werden. Die meisten Verfahren werden und müssen an künstlich erzeugten Datensätzen gemessen werden. Die Erstellung komplexer und realitätsnaher Signale sowie ein einheitlicher Benchmark zum Vergleich mit anderen Verfahren stellen daher eine weitere große Herausforderung dar. Viele Verfahren funktionieren unter fest definierten Voraussetzungen (bzw. Signaleigenschaften), erzielen aber beim Vergleich mit real abgeleiteten Signalen deutlich schlechtere Ergebnisse.

Wenig Beachtung sowohl in der Literatur als auch bei der Entwicklung neuer Verfahren finden zwei in der Natur vorkommende Eigenschaften neuronaler Netze: (i) *Bursts* und (ii) die Überlappung von Signalen. *Bursts* treten auf, wenn Zellen einer ständigen Reizung ausgesetzt sind und dadurch in sehr kurzen Abständen Aktionspotenziale aussenden. Die Zeit zwischen zwei Aktionspotenzialen reicht nicht zur vollständigen Regeneration der Zelle, wodurch die gesendeten Impulse in ihrer Amplitude stetig kleiner werden. Während dies bei einer manuellen Auswertung von einem geübten Beobachter erkannt wird, ermitteln automatisierte Verfahren zusätzliche, in der Realität nicht vorhandene *Units*.

Eine Überlappung zweier oder mehrerer Signale entsteht, wenn zwei oder mehrere Zellen einer synchronen Reizung ausgesetzt sind und ihre Impulse gleichzeitig aussenden. Von einem Sensor wird nur die Superposition der Einzelsignale erfasst. Eine Trennung in die Einzelsignale erfordert einen hohen Aufwand sowie die Kenntnis der in unmittelbarer Nähe vorhandenen *Einzelunits*.

In vielen Publikationen wird einerseits aufgrund der Verwendung künstlicher Signale aber auch wegen der Komplexität des Problems häufig nur ein Sensor bzw. Kanal betrachtet. Gerade bei der Verwendung räumlich hochaufgelöster Sensoren kann sich dabei ein enormer Nachteil ergeben. Weiß man um die geometrischen Beziehungen einzelner Sensoren, können benachbarte Sensoren als unterstützendes Element bei der Signalauswertung verwendet werden. Global auftretende Störimpulse beispielsweise werden von mehreren Sensoren erfasst und können zur Entstörung eingesetzt werden. Abgeleitete synchrone Signale werden unter Umständen ebenfalls von benachbarten Sensoren erfasst und können zur Trennung genutzt werden. Erste Untersuchungen in diese Richtung wurden bisher nur in [205] gefunden.

Viele Neu- und Weiterentwicklungen von Sensorsystemen besitzen eigene Schnittstellen und Datenformate, so dass eine Verwendung vorhandener Daten für die Validierung eigener Verfahren meist mit einem hohen Aufwand verbunden ist. Ein Vergleich mit bereits publizierten Verfahren ist deshalb sehr umständlich. Die Bündelung vorhandener Verfahren, einheitliche Standards für

die Speicherung von Daten und die Möglichkeit, unterschiedliche Algorithmen mit einer großen Auswahl realer Datensätze zu vergleichen, könnte zu deutlich schnelleren Ergebnissen auf diesem Gebiet führen. Einen ersten Versuch unternimmt das Netzwerk *FIND (Finding Information in Neural Data)* [320]. *FIND* soll die Möglichkeit bieten, neue Algorithmen in ein gemeinsames Framework zu integrieren und auf den bereits vorhandenen und gut dokumentierten Schnittstellen aufzubauen.

Viele der untersuchten *Spike sorting*-Algorithmen liefern im Wesentlichen nur dann nutzbare Ergebnisse, wenn folgende Voraussetzungen erfüllt sind:

- Spikeformen besitzen während der gesamten Messdauer einen stationären Charakter;
- Neuronen besitzen eine fixe Platzierung auf dem Sensor und ändern sich nicht während der gesamten Messdauer;
- Die im abgeleiteten Signal vorhandenen Rauschanteile sind stationär.

4 Aufgabenstellung

Die technologischen Fortschritte bei Systemen zur Analyse elektrophysiologischer Vorgänge in Zellen werden durch zwei Faktoren bestimmt. Der erste Faktor besteht aus der Hardware – also die Sensortechnik, mit der Signale aus den Zellen abgeleitet werden. Der zweite Faktor beinhaltet die notwendige Software, die eine unkomplizierte Analyse der abgeleiteten Signale ermöglicht. Beide Faktoren beeinflussen sich wechselseitig, so dass beispielsweise Verbesserungen in Analyseverfahren zu neuen Möglichkeiten in der Sensortechnik führen und umgekehrt.

Durch die Entwicklung von Multielektroden-Arrays (MEA) konnte die Ableitung elektrophysiologischer Signale aus Zellpopulationen im Vergleich zur *Patch clamp*-Technik deutlich vereinfacht und weitestgehend automatisiert werden. Die Verwendung von CMOS-Prozessen in der Sensorherstellung setzt zumindest theoretisch der Sensoranzahl keine Grenzen auf einem Chip. Die technologische Machbarkeit konnte bereits demonstriert werden [23, 89]. Dennoch besteht die Mehrzahl aktuell verwendeter Arrays überwiegend aus bis zu 128 Sensoren. Ein Grund dafür liegt am Mangel notwendiger Signalverarbeitungsalgorithmen.

Während bei der Kultivierung von Zellen auf der Sensoroberfläche nur noch wenige Handgriffe notwendig sind, ergibt sich ein hoher Aufwand bei der Auswertung von Signalen, werden diese von 128 oder mehr Sensoren gleichzeitig abgeleitet. Ein Nutzen aus der Vielzahl parallel abgeleiteter Informationen entsteht erst, wenn sie unmittelbar nach der Ableitung für die Auswertung zur Verfügung stehen [321].

Die in Abbildung 4.1 dargestellten Arbeitsschritte sind notwendig, um abgeleitete Signale eines Sensors vom Störanteil zu befreien, die darin enthaltenen Aktionspotenziale zu extrahieren und anschließend ihren Quellen (*Units*) zuzuordnen. Eine Automatisierung dieser Aufgaben ist bisher nur teilweise gelungen und erfordert vielfach noch manuelle Arbeitsschritte.

Eine manuelle Auswertung von Signalen, wenn auch nur in Teilen, ist bei Systemen mit 128 oder mehr Sensoren für den kommerziellen Einsatz kaum noch möglich. Als kritische Stellen konnten die

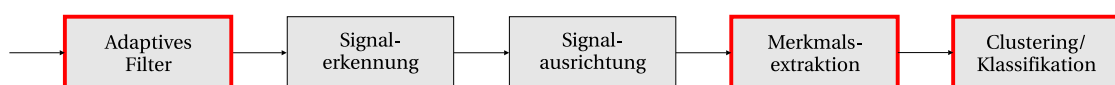


Abbildung 4.1 Die rot gekennzeichneten Verarbeitungsschritte werden innerhalb dieser Arbeit genauer untersucht.

in Abbildung 4.1 rot dargestellten Arbeitsschritte identifiziert werden. Sie sollen den Hauptgegenstand dieser Arbeit bilden und in Bezug auf eine vollständige Automatisierung genauer untersucht werden.

Eine Automatisierung aller Signalverarbeitungsschritte, wie sie in Abbildung 4.1 dargestellt ist, verfolgt zwei Ziele. Das erste Ziel ist die praktische Nutzbarmachung von MEAs mit 128 und mehr Sensoren. Außerhalb der Grundlagenforschung existiert eine Vielzahl von Anwendungen, die mit Hilfe neuronaler Sensorik neue Möglichkeiten bieten. Dazu zählen beispielsweise die medizinische Diagnostik (High-Throughput-Systeme) sowie neuartige Mensch-Maschine-Schnittstellen (Prothesen). Das zweite Ziel ist die Eliminierung menschlicher Einflüsse bei der manuellen Signalauswertung und -analyse. Mit Hilfe geeigneter Verfahren und Algorithmen sollen durch objektive Kriterien wiederholbare Signalanalysen realisiert werden.

Eine wesentliche Ursache für das Fehlen geeigneter Verfahren liegt im stochastischen Charakter von Signalen aus biologischen Quellen. Nur wenige Signalparameter sind bekannt und können deshalb zur Systemanalyse eingesetzt werden. Bei der Verwendung parameterintensiver Verfahren fehlt die notwendige Flexibilität, um sich an unbekannte Systeme anzupassen. Weitaus schwieriger gestaltet sich diese Aufgabe, wenn es darum geht, allgemein gültige Verfahren für die Vielzahl unterschiedlicher Sensorsysteme zu entwickeln.

Der Schwerpunkt dieser Arbeit ist deshalb im Bereich der flexiblen Parameterbestimmung durch stochastische Verfahren für eine unüberwachte Auswertung (*Spike sorting*) neuronaler Signale angesiedelt. Sowohl die Merkmalsextraktion als auch die Clusteranalyse stellen in Bezug auf das *Spike sorting* immer noch das größte Problem dar und sollen innerhalb dieser Arbeit intensiver untersucht werden.

Durch die Eliminierung fixer Parameter und den Austausch durch statistische Verfahren ergibt sich ein weiterer Vorteil für die Signalanalyse. Werden Parameter während der Laufzeit bestimmt und angepasst, ist eine Auswertung in Echtzeit möglich. Das nachfolgende Kapitel berücksichtigt und untersucht deshalb Verfahren und Methoden, mit denen Analysen unmittelbar nach der Signableitung durchgeführt werden können.

5 Untersuchungen zur automatischen Klassifikation von Aktionspotenzialen

Die Erhöhung der Sensoranzahl auf einem MEA und die damit verbundenen Anwendungsgebiete erfordern eine durchgängig automatische Signalaufbereitung und -auswertung. Mit den in Kapitel 3 vorgestellten Verfahren ist dies bisher nur ansatzweise gelungen. Das folgende Kapitel zeigt Schwachstellen in vereinzelt Verarbeitungsschritten auf und untersucht Lösungen für ein automatisches *Spike sorting*.

5.1 Vorbetrachtungen

Ein System zum Sortieren von Spikes besteht aus fünf wesentlichen Einzelkomponenten, die dazu dienen, spike-ähnliche Kurvenverläufe in einem kontinuierlichen Signalverlauf zu erkennen und sie einer eindeutigen Quelle zuzuordnen:

- Filter,
- Signalerkennung,
- Signalausrichtung,
- Merkmalsextraktion, sowie
- Gruppierung von Merkmalen.

Ausgangspunkt ist ein über eine Elektrode abgeleitetes und analog vorverarbeitetes Signal $x(t)$, das aus einer unbekannt Anzahl *Units* $s(t)$ besteht und durch ein breitbandiges Störsignal aus korrelierten und unkorrelierten Rauschanteilen $n(t)$ überlagert wird (vgl. Gleichung 5.1). Die korrelierten Rauschanteile entstehen durch synchrone Aktivitäten von Neuronen in unmittelbarer Umgebung eines Sensors, besitzen aber aufgrund ihrer Entfernung eine stark gedämpfte Amplitude und können so nur schwer von unkorreliertem Rauschen unterschieden werden [168, 249, 322]. Deshalb werden sie für die weitere Analyse vernachlässigt. Unkorrelierte Störanteile entstehen vor allem durch die Elektrode und die Verwendung analoger Elektronikbauteile.

$$x(t) = s(t) + n(t) \tag{5.1}$$

Das abgeleitete Signal $x(t)$ wird entsprechend verstärkt und digitalisiert und liegt im Folgenden als diskrete Signalfolge $x(n)$ vor.

Trotz einer bereits erfolgten analogen Vorfilterung wird das digitalisierte Signal einer weiteren Filterstufe zugeführt. Für eine optimale Filterung ist die Diskrete Wavelet-Transformation (DWT) geeignet. In [169] konnte nachgewiesen werden, dass im Vergleich zu FIR-Filtern eine geringere Signalverzerrung erfolgt und durch die filterbankähnliche Signaltrennung Störfrequenzen gezielter reduziert werden können. Darüber hinaus ermöglicht die DWT durch Modifikation der Wavelet-Koeffizienten eine adaptive Filterung, die sich an variierende Rauschanteile anpassen lässt.

Voraussetzung für eine wavelet-basierte Filterung ist die Wahl eines geeigneten Basis-Wavelets, das eine hohe Korrelation mit den zu analysierenden Nutzsignalfrequenzen besitzt. Die Filterung erfolgt über die Modifikation der Waveletkoeffizienten, die durch Korrelation zwischen Signal $x(n)$ und Wavelet $\varphi(n)$ entstehen. Aufgrund der unterschiedlichen geometrischen Eigenschaften von Basis-Wavelets können dadurch verschiedene Signaleigenschaften hervorgehoben oder reduziert werden. Ob bestimmte Basis-Wavelets für die Filterung bessere Resultate erzielen, wird in Abschnitt 5.3 ausführlicher untersucht.

Ein häufig verwendetes Filterverfahren auf Basis von Wavelets zur Entstörung neuronaler Signale wurde ursprünglich für die Filterung verrauschter Bilddaten entwickelt und als *VisuShrink* bezeichnet [170]. Bildsignale unterscheiden sich aber von neuronalen Signalen, so dass *VisuShrink* nur bedingt als optimales Verfahren genutzt werden kann. Im nachfolgenden Abschnitt 5.5 wird deshalb ein modifiziertes Filterverfahren vorgestellt und untersucht, mit dem eine bessere Abschätzung der Rauscheigenschaften möglich ist und infolgedessen eine verbesserte Störsignalentfernung erzielt werden kann.

Für die Analyse der abgeleiteten Zellinformationen sind die zeitlich begrenzten spike-ähnlichen Signalausschnitte von Interesse, die mithilfe geeigneter Verfahren im Signalverlauf erkannt und extrahiert werden. Zum isolierten Signalausschnitt wird der Zeitpunkt des Auftretens gespeichert, da dieser ebenfalls für die weitere Analyse Relevanz besitzt. Zur Erkennung, Extraktion und Ausrichtung von Spikes existieren bereits automatische und echtzeitfähige Implementierungen und sollen deshalb nicht Gegenstand dieser Arbeit sein.

Ein extrahierter Spike muss anschließend seiner Ursprungsquelle (Neuron) zugeordnet werden und bildet zusammen mit den Zeitinformationen einen sog. *Spike train*. Aus der parallelen Betrachtung von *Spike trains* vieler Neuronen lassen sich die gewünschten Kommunikationsmuster ableiten. Die Zuordnung eines unbekanntes Spikes erfolgt durch zwei Schritte. In einem ersten Schritt werden die Merkmale des Spikes extrahiert, um sie anschließend anhand gleicher Merkmale zu gruppieren. Mit Hilfe der Clusteranalyse wird in einem zweiten Schritt die Anzahl der Cluster bestimmt, wodurch sich unmittelbar die Anzahl der Neuronen ableiten lässt.

Zur Bestimmung von Merkmalen wurde bisher die Hauptkomponentenanalyse (PCA) eingesetzt. Dieses Verfahren eignet sich jedoch nicht für eine Merkmalsextraktion in Echtzeit, da der zugrunde liegende Algorithmus auf der Bestimmung von Eigenwerten einer Matrix basiert und deshalb nur

offline erfolgen kann. Durch Betrachtung zeitlich begrenzter Abschnitte (Fenster) kann zwar eine schnellere Bestimmung erfolgen, im Falle unberücksichtigter Signalausschnitte können allerdings andere Merkmale dominieren, die eine eindeutige Zuordnung zu Merkmalen aus einem vorher betrachteten Abschnitt erschweren. In Abschnitt 5.6 erfolgt die Untersuchung eines Verfahrens auf Basis eines neuronalen Netzes, mit dem eine Bestimmung in Echtzeit ermöglicht wird. Weitere Vorteile dieses Verfahrens im Vergleich zur Offline-PCA sind ein geringerer Speicherbedarf sowie ein robusteres Verhalten gegenüber Signalschwankungen.

In einem letzten Schritt soll die Clusteranalyse untersucht werden. Die bisher eingesetzten Verfahren benötigen manuelle Schritte, bei denen beispielsweise die Anzahl der Cluster vorgegeben werden muss. Das in Abschnitt 5.7 untersuchte Verfahren ermittelt die Anzahl der Cluster ohne manuellen Eingriff und ermöglicht damit eine automatische Bestimmung der Zugehörigkeit extrahierter Signale zu einem Ursprungsneuron.

Der Schwerpunkt der nachfolgenden Untersuchungen konzentriert sich auf drei Punkte. Den ersten Schwerpunkt bildet die Vorstellung und Untersuchung eines verbesserten adaptiven Filteralgorithmus zur Modellierung bzw. Schätzung individueller Störsignaleigenschaften jedes einzelnen Sensors. Damit ist es möglich, Rauschanteile im Signalverlauf noch besser zu reduzieren. Den zweiten Schwerpunkt bilden Untersuchungen zu einem Verfahren, mit dem sich Merkmale in Echtzeit extrahieren lassen und der robuster gegenüber Störeinflüssen im Vergleich zur klassischen Hauptkomponentenanalyse ist. Den dritten und letzten Schwerpunkt bilden Untersuchungen eines Clusteralgorithmus, mit dem eine automatische Bestimmung der Anzahl der *Units* ermöglicht wird, so dass eine Zuordnung des extrahierten Spikes erfolgen kann.

5.2 Verwendung und Erzeugung von Testsignalen

Für einen Funktionsnachweis einzelner Systemkomponenten und des Gesamtsystems werden Testsignale benötigt. Obwohl reale Signale für einen Funktionsnachweis notwendig sind, ermöglichen künstlich erzeugte Signale aufgrund ihrer bekannten Signalkomponenten umfangreichere Tests einzelner Komponenten und liefern die Grundlage für qualitative Aussagen hinsichtlich der Leistungsfähigkeit sowie der Grenzen einzelner Systembestandteile. Des Weiteren ermöglichen sie einen direkten Vergleich mit anderen, bereits etablierten Verfahren und gewähren auf Grundlage der bekannten Signalparameter eine Validierbarkeit der Ergebnisse. Die Verwendung realer Signale würde zwar einen Test der Komponenten unter realen Bedingungen ermöglichen, verhindert aber eine Validierbarkeit der Ergebnisse durch unterschiedliche Auslegung bzw. subjektive Interpretation der im Signal vorhandenen Stör- und Nutzsignalanteile.

Für die in dieser Arbeit untersuchten Verfahren sind zwei Arten von Testsignalen erforderlich.

Das erste Testsignal wird für den Vergleich des in dieser Arbeit vorgestellten Filterverfahrens benötigt und sollte lediglich die Frequenzen für Stör- und Nutzsignalanteile realitätsnah abbilden.

Darüber hinaus sollten die Störsignalanteile variierbar sein und das gleiche Signal zum Vergleich ohne Störsignalanteile vorliegen. Die Anzahl der im Signal enthaltenen *Units* spielen dabei lediglich eine untergeordnete Rolle.

Für eine Validierung der Merkmalsextraktion und des Clusteralgorithmus wird dagegen ein Testsignal benötigt, bei dem sowohl Zeitpunkt als auch Quelle des jeweils entstandenen Aktionspotenzials bekannt sind, um eine richtige Zuordnung (Klassifizierung) vornehmen zu können.

Das Testsignal zur Validierung der Filterstufe wird mithilfe der Gleichungen zur Modellierung von *Spikes* nach [323] realisiert. Das zugrunde liegende Modell basiert auf zwei Differentialgleichungen (vgl. Gleichung 5.2 und 5.3 sowie Bedingung 5.4), mit denen eine schnelle und eine langsame Komponente unter Zuhilfenahme unterschiedlicher Parameter ein intern abgeleitetes Aktionspotential simulieren.

$$v'_{\text{intra}} = 0.04v_{\text{intra}}^2 + 5v_{\text{intra}} + 140 - u + I \quad (5.2)$$

$$u' = a(bv_{\text{intra}} - u) \quad (5.3)$$

$$\text{wenn } v_{\text{intra}} \geq 30 \text{ mV, dann } \begin{cases} v_{\text{intra}} \leftarrow c \\ u \leftarrow u + d \end{cases} \quad (5.4)$$

Zur Modellierung unterschiedlicher Aktionspotenziale können die Parameter a, b, c, d und I variiert werden. Eine Übersicht der Parameter und der damit verbundenen Eigenschaften der Aktionspotenziale kann aus [323] und [3] entnommen werden.

Der daraus resultierende Spannungsverlauf v_{intra} entspricht dabei einer internen Ableitung und kann durch zweifache Ableitung in ein extern abgeleitetes Signal überführt werden (vgl. Gleichung 5.5) [316].

$$v_{\text{extra}} = v''_{\text{intra}} \quad (5.5)$$

Durch die zweifache Ableitung eines intern erzeugten Signals wird eine ideale kapazitive Ableitung durch eine Elektrode simuliert. Dabei werden weder die physikalischen noch die elektrischen Eigenschaften von Sensoren berücksichtigt. Das resultierende Signal v_{extra} ist damit frei von Störeinflüssen des Sensors und nachfolgenden analogen Elektronikkomponenten und dient als rauschfreies Vergleichssignal. Zusätzliche Störanteile, die durch entsprechende Filter reduziert werden sollen, werden zusätzlich additiv überlagert. Das dafür notwendige Matlab-Script ist unter `Testsignale/Izhikevich/spikesamples.m` auf dem beigefügten Datenträger verfügbar. Eine ausführliche Beschreibung der Funktion und Parameter ist im Anhang C.3 dokumentiert.

Für eine Validierung der Merkmalsextraktion sowie des Clusterverfahrens wurde das Softwarepaket *Noisy Spike Generator* (NSG) [232, 315, 316, 324] ausgewählt, da es unter Matlab verfügbar ist und

die zuvor genannten notwendigen Anforderungen erfüllt. Mit Hilfe einstellbarer Parameter können neben Signallänge und Abtastfrequenz auch die Anzahl der *Units* (hier als *target* bezeichnet), Signalrauschabstand, *Jitter* (zeitliche Verschiebung der extrahierten Spikesignale) und weitere Signaleigenschaften (siehe [324]) konfiguriert werden. Anschließend stehen Informationen (wie z.B. Quelle und Zeitpunkt des Auftretens) der mittels zufälligen Prozessen generierten *Spikes* in einem Vektor zur Verfügung.

Sollen lediglich Verfahren zur Merkmalsextraktion oder Clusteranalyse untersucht werden, sind keine kontinuierlichen Signale notwendig. Mit Hilfe der verfügbaren Zeitinformationen können die einzelnen *Spikes* aus dem Signal extrahiert werden. Das dazugehörige Matlab-Script ist unter `Testsignale/NoisySpikeGenerator` zu finden und in Anhang C.3 näher erläutert.

Reale Signale sind unter `Testsignale/Plexon` im Plexon-Format (`plx`) gespeichert und werden ebenfalls zur Validierung der Verfahren genutzt. Im Gegensatz zu künstlich erzeugten Signalen stehen die Ursprungsquellen nicht als Vergleich zur Verfügung. Hier kann im Falle der Merkmalsextraktion lediglich ein visueller Vergleich zwischen etablierten Methoden und dem in dieser Arbeit vorgestellten Verfahren erfolgen.

5.3 Vergleich von Basis-Wavelets zur Signalfilterung

Wie in Kapitel 3 aufgezeigt, konnte in zahlreichen Veröffentlichungen [170, 183, 189, 193, 195, 197–199, 325–329] bereits nachgewiesen werden, dass eine wavelet-basierte Filterung eine Alternative zu anderen existierenden Filtermethoden darstellt. Insbesondere ihre adaptiven Filterstufen können bei der Verarbeitung neuronaler Signale von Vorteil sein.

Grundlegend erfolgt bei der Wavelet-Transformation die Faltung eines beliebigen Signals $x(n)$ mit einem Wavelet ψ , so dass die resultierenden Wavelet-Koeffizienten ein Maß für die Korrelation zwischen Wavelet und untersuchtem Signalausschnitt darstellen. Je besser ein Wavelet mit der Ziel Frequenz eines zu analysierenden Signals $x(n)$ korreliert, desto deutlicher unterscheiden sich diese Koeffizienten in ihrem Betrag von anderen Signalanteilen. Aufgrund der verschiedenartigen Eigenschaften existierender Basis-Wavelets können sehr unterschiedliche Ergebnisse bei der Signalfilterung entstehen. Diese werden deshalb in dieser Arbeit genauer untersucht.

Bei einer Filterung durch Wavelets wird ein Eingangssignal in einen hoch- und tiefpassgefilterten Signalanteil (Detail- bzw. Approximationsband) zerlegt. Durch Kaskadierung mehrerer Filterstufen kann der jeweils tiefpassgefilterte Signalanteil in zwei weitere bandbegrenzte Anteile aufgeteilt werden. Bei einer fünfstufigen Dekomposition erhält man ein Approximationsband (A_5) und fünf Detailbänder (D_5 bis D_1). Durch Nullsetzen der Koeffizienten in A_5 erfolgt mittels *Detrending* eine Gleichtaktunterdrückung; durch Modifikation von D_5 bis D_1 das sog. *Denoi-sing*.

In [168, 201, 273] werden hauptsächlich das Haar-Wavelet sowie einige Vertreter der Daubechies- und Coiflet-Familie verwendet, da sie eine hohe natürliche Korrelation mit Aktionspotenzialen aufweisen (vgl. Abbildung 5.1). Ein direkter Vergleich zur Wahl eines optimalen Wavelets für die Filterung unter Verwendung aller vorhandenen Basis-Wavelets ist bisher bei neuronalen Signalen nicht erfolgt und wird nachfolgend durchgeführt.

Im Gegensatz zu einem EKG-Signal [197], für dessen Filterung ein Daubechies-Basis-Wavelet 8. Ordnung (Daub8) die besten Ergebnisse erzielen konnte, ist der Kurvenverlauf abgeleiteter Aktionspotenziale von der Lage zum Sensor, der Form des Neurons und der Art der Zelle abhängig und deshalb keineswegs konstant.

Die nachfolgenden Testsignale wurden mit Hilfe des *Noisy Spike Generators* [315, 316] erzeugt, enthalten zwei bis vier *Units* und wurden mit unterschiedlichen Rauschpegeln von 1 dB bis 20 dB überlagert. Das gefilterte Signal wurde anschließend mit einem Signal ohne Störanteile verglichen. Folgende Wavelet-Familien werden dabei untersucht:

- Daubechies 4., 5., 6., 7. und 8. Ordnung;
- Symlets 5., 6., 7. und 8. Ordnung;
- Coiflets 3. Ordnung;
- Biorthogonale Wavelets 1.3 und 1.5.

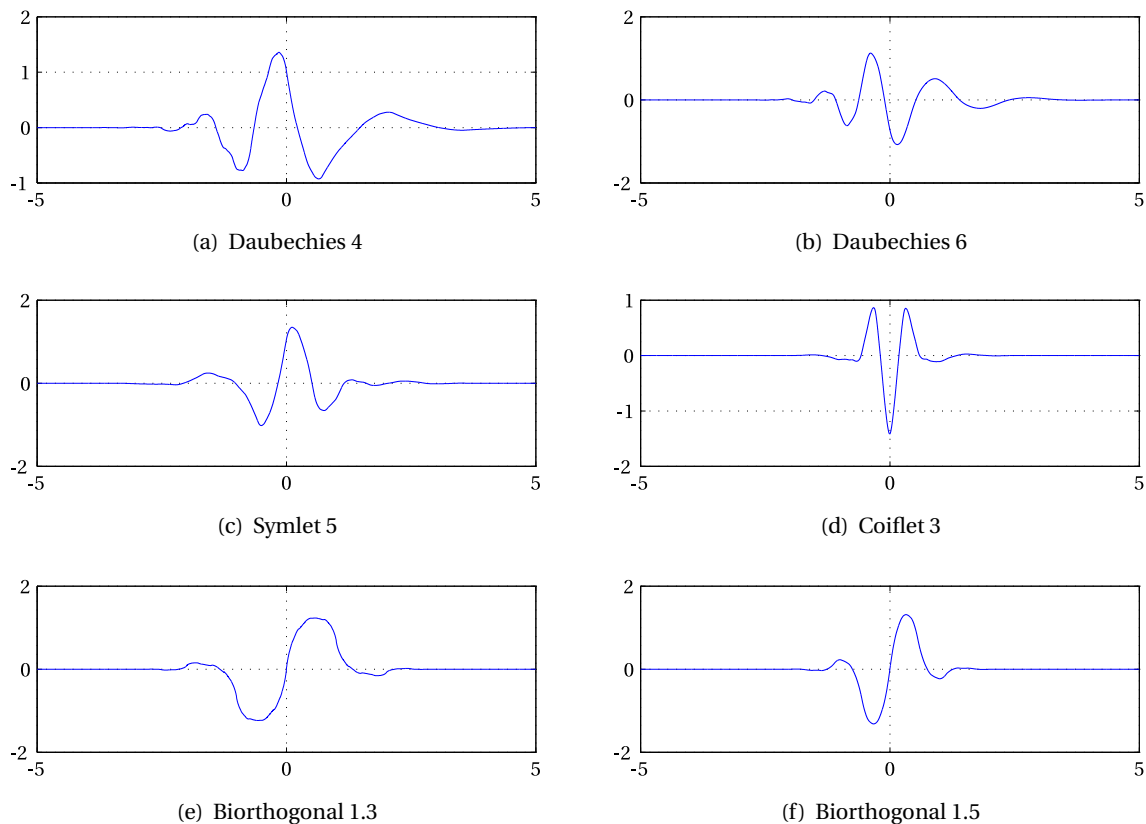


Abbildung 5.1 Morphologische Eigenschaften von unterschiedlichen Basis-Wavelets.

Für den Vergleich von gefiltertem Signal y und störanteilsfreiem Signal x wurden zwei Varianten gewählt. Die erste Variante bestimmt den mittleren quadratischen Fehler (RMSE, engl. *root mean squared error*) (Gleichung 5.6). Dabei werden Signaldifferenzen als Fehler kumuliert, aber weder Signaldämpfungen noch Gleichtaktunterdrückungen berücksichtigt. Die zweite Variante ermittelt die Kovarianz zweier Signale [170, 193] und berücksichtigt dabei sowohl Signaldämpfungen als auch Gleichtaktunterdrückungen (Gleichung 5.7).

$$\text{RMSE} = \sqrt{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (x_i - y_i)^2} \quad (5.6)$$

$$\text{Cov} = \frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y}) \quad (5.7)$$

Für einen qualitativen Vergleich zwischen den Methoden zur Bestimmung des Fehlers aus Gleichung 5.6 und 5.7 wurde mit Hilfe des *Noisy Spike Generators* ein Signal mit einem Signalrauschabstand (SNR) von 5 dB sowie ein Vergleichssignal mit einem SNR von 100 dB erzeugt. Das Signal mit Störanteilen wurde mittels DWT anhand der oben genannten Basis-Wavelets in sechs Frequenzbänder zerlegt, die beiden untersten Frequenzbänder A_5 und D_5 vollständig gelöscht und die verbleibenden Detailbänder anhand des in [170] beschriebenen Verfahrens modifiziert. Eine Abschätzung der Rauschanteile erfolgte auf Basis der Koeffizienten aus D_1 . Die modifizierten Koeffizienten wurden mit der inversen DWT in den Zeitbereich rücktransformiert.

In Abbildung 5.2 wurde auf der linken Seite die Kovarianz zwischen dem rücktransformierten Signal y und dem störanteilsfreien Signal x in Abhängigkeit der verschiedenen Basis-Wavelets abgetragen. Wavelets mit einem hohen Betrag für die Kovarianz besitzen kleinere Fehler zwischen entstörtem und störanteilsfreiem Signal. Für das untersuchte Signal ergeben sich zwischen den Basis-Wavelets nur geringe Unterschiede in der Kovarianz, jedoch erreichen sowohl die beiden biorthogonalen Wavelets sowie das Daubechies-Wavelet und Symlet 5. Ordnung eine höhere Kovarianz als die anderen Basis-Wavelets. Auf der rechten Seite von Abbildung 5.2 erfolgt die Bestimmung der Kovarianz zwischen Originalsignal und eines mit biorthogonalen Wavelet gefilterten Signals in Abhängigkeit unterschiedlicher Signalrauschabstände von 1 dB bis 20 dB. Erwartungsgemäß steigt mit zunehmendem Signalrauschabstand die Kovarianz zwischen gefiltertem und störanteilsfreiem Signal. Bei den anderen Basis-Wavelets ist ein ähnlicher Trend erkennbar.

Auf der linken Seite in Abbildung 5.3 erfolgte der gleiche Test; als Fehlermessmethode wurde dieses Mal allerdings Gleichung 5.6 verwendet. Bei der Bestimmung des mittleren quadratischen Fehlers werden kleinere Fehler durch einen geringeren Betrag dargestellt. Erwartungsgemäß ergeben sich im Vergleich zu Abbildung 5.2 für alle Basis-Wavelets geringe Unterschiede, es werden aber bei den Daubechies-Wavelets 5. und 6. Ordnung sowie dem Symlet 5. Ordnung die geringsten Fehler gemessen. Anhand des biorthogonalen-1.3 Wavelets erfolgt ein Vergleich bei

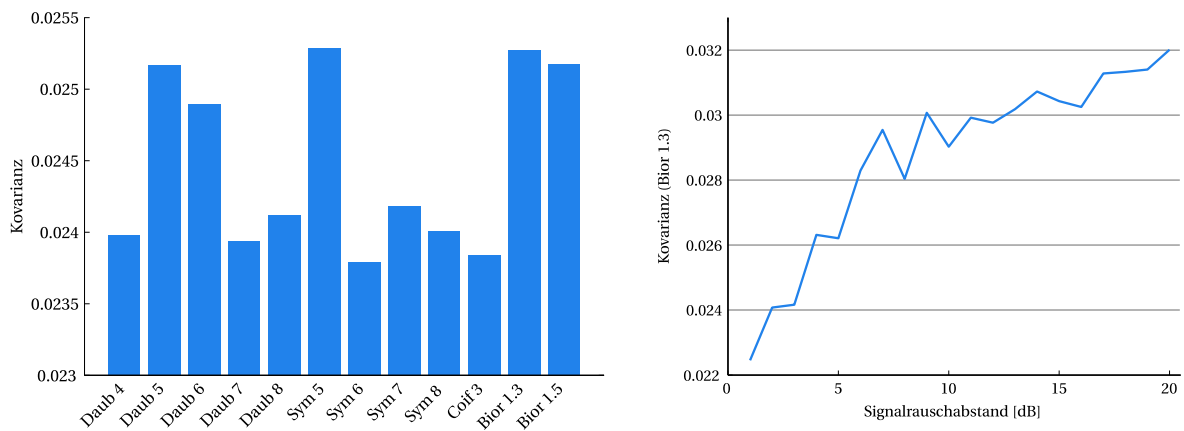


Abbildung 5.2 Vergleich unterschiedlicher Basis-Wavelets beim *Denoising* mit Hilfe der Kovarianz bei einem Signalrauschabstand von 5dB (links), sowie Verlauf der Kovarianz für ein biorthogonales Wavelet bei unterschiedlichen Signalrauschabständen (rechts).

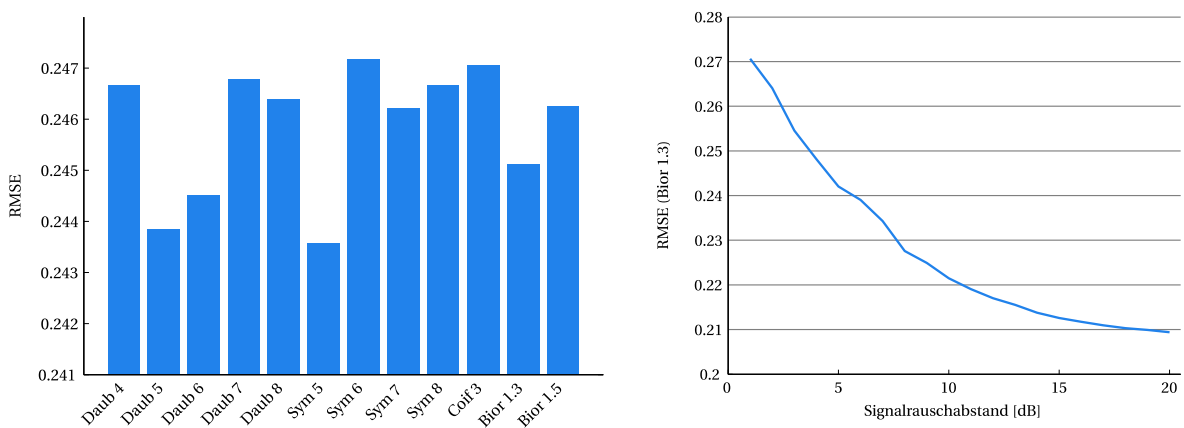


Abbildung 5.3 Vergleich unterschiedlicher Basis-Wavelets beim *Denoising* mit Hilfe des mittleren quadratischen Fehlers (RMSE) bei einem Signalrauschabstand von 5dB (links), sowie Verlauf des mittleren quadratischen Fehlers für ein biorthogonales Wavelet bei unterschiedlichen Signalrauschabständen (rechts).

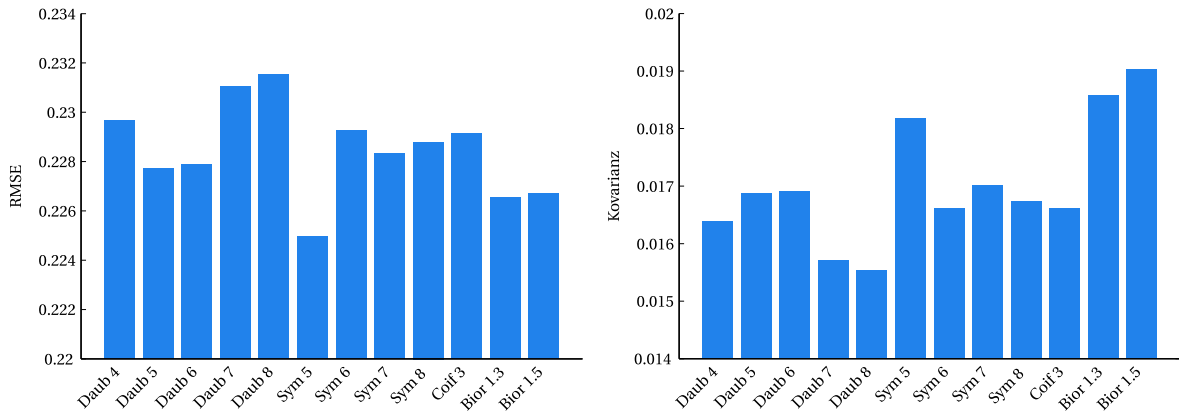


Abbildung 5.4 Vergleich unterschiedlicher Wavelets beim *Denoising* mit *soft threshold* auf allen Bändern, wobei eine Schätzung von σ_{noise} anhand von Koeffizienten aus D_1 erfolgt.

unterschiedlichen Signalrauschabständen von 1 dB bis 20 dB [316]. Auch hier sinkt erwartungsgemäß mit steigendem Signalrauschabstand der Fehler zwischen gefiltertem und störanteilsfreiem Signal.

Die Verwendung beider Kriterien zur Bestimmung von Fehlern erzielt nahezu die gleichen Ergebnisse. Lediglich durch die Berücksichtigung von Signaldämpfungen und Gleichanteilen bei der Bestimmung des Fehlers anhand Gleichung 5.7 werden geringe Unterschiede im Vergleich zur Methode aus Gleichung 5.6 erreicht. Eine qualitative Aussage über ein besseres oder schlechteres Basis-Wavelet zur Entstörung kann mit beiden Messmethoden erzielt werden.

Um dieses Ergebnis zu vertiefen, wurde ein weiteres Signal mit allen Basis-Wavelets entstört und deren Fehler mittels RMSE und Kovarianz bestimmt. Die Darstellung der Ergebnisse erfolgt in Abbildung 5.4. Die Schätzung des Rauschanteils erfolgt auf Basis der Koeffizienten aus D_1 , deren anschließende Modifizierung mithilfe von *soft threshold* erfolgt. Auch hierbei zeigt sich, dass die beiden biorthogonalen Wavelets und das Symlet 5. Ordnung die besten Ergebnisse erzielen.

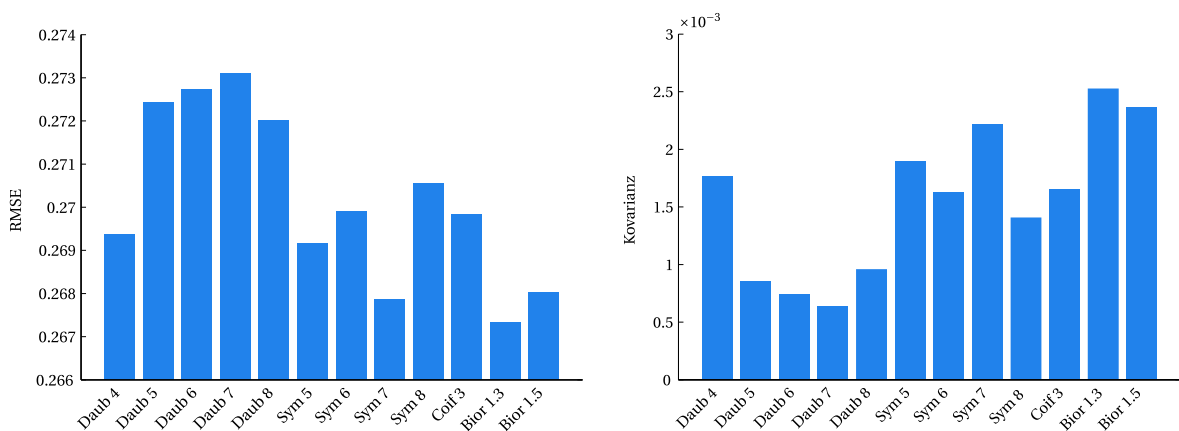


Abbildung 5.5 Vergleich unterschiedlicher Wavelets beim *Denoising* mit *soft threshold* auf allen Bändern, wobei eine Schätzung von σ_{noise} anhand von Koeffizienten aus D_1 bis D_5 erfolgt.

In einer letzten Untersuchung erfolgt der Vergleich von Basis-Wavelets anhand einer anderen Bestimmung von σ_{noise} . Hierbei erfolgt die Abschätzung des Rauschanteils σ_{noise} jeweils anhand des Koeffizientenbandes, das anschließend mittels *soft threshold* modifiziert wird. Bei dieser Rauschabschätzung ist kein weißes Rauschen im Signal notwendig; es können aber neuronale Aktivitäten in den einzelnen Detailbändern die Rauschabschätzung beeinflussen. Auch bei diesem Verfahren erzielen die biorthogonalen Wavelets den geringsten Fehler, gefolgt von Symlets 5. und 7. Ordnung.

Beim visuellen Vergleich zwischen störanteilfreiem Originalsignal und gefiltertem Signal entstehen signifikante Signalverzerrungen, die exemplarisch am Beispiel der vier ausgewählten Wavelets in Abbildung 5.6 dargestellt werden. Diese sind weniger auf das *Detrending*, sondern mehr auf das *Denoising* zurückzuführen. Der schwarz dargestellte Kurvenverlauf zeigt das Originalsignal ohne Störanteile. Dem rot, grün und blau dargestellten Signalverlauf wurden Störanteile von 15 dB, 10 dB und 5 dB hinzugefügt und anschließend unter Bestimmung von σ_{noise} aus D_1 mittels *soft threshold* entfernt.

Erfolgt die Entstörung anhand einer Schwelle, die beispielsweise aus D_1 ermittelt wird, können vergleichsweise geringe Verzerrungen festgestellt werden, als bei der Verwendung mehrerer Schwellenwerte, die aus den jeweiligen Koeffizienten D_1 bis D_5 bestimmt werden.

5.4 Wavelet-Transformation von finiten Signalen

Bei der Implementierung der wavelet-basierten Filterstufe in ein Echtzeitsystem muss zum Zwecke der Signalverarbeitung eine Aufteilung des Datenstroms in finite Abschnitte erfolgen. Dabei treten an den Grenzen Unstetigkeiten (sog. *edge effects*) auf, die zu Signalverzerrungen oder -artefakten führen. Es existieren unterschiedliche Lösungsansätze, bei denen finite Signale beispielsweise durch symmetrische oder periodische Erweiterungen ergänzt werden [181, 330] oder bei denen extrapolierte Wavelets Anwendung finden [331, 332].

Der in Abbildung 5.7 dargestellte Kurvenverlauf (blau) zeigt ein Signal, das an den markierten vertikalen Linien in finite Abschnitte eingeteilt wurde, um über eine Wavelet-Transformation eine Filteroperation durchzuführen. Eine anschließende Rücktransformation ergibt den in rot dargestellten Kurvenverlauf, bei dem Unstetigkeiten an den Fenstergrenzen deutlich erkennbar sind. Trotz der Verwendung unterschiedlicher Signalerweiterungsmethoden (wie z.B. aus [181]) sind keine signifikanten Veränderungen im synthetisierten Signalverlauf erkennbar.

Außerdem konnte festgestellt werden, dass diese Unstetigkeiten vor allem durch das *Detrending* (also dem Löschen der untersten Wavelet-Koeffizienten aus cA_5 und cD_5) hervorgerufen werden, die zur Gleichaktunterdrückung dienen. Beim *Denoising* (der Modifikation der Koeffizienten von cD_4 bis cD_1) fallen diese Signalverformungen deutlich geringer aus.

Treten diese Artefakte außerhalb eines Aktionspotenzials auf, ergeben sich für den weiteren Analysevorgang keine Nachteile. Selbst bei Artefakten mit sehr großen Amplituden unterscheidet sich

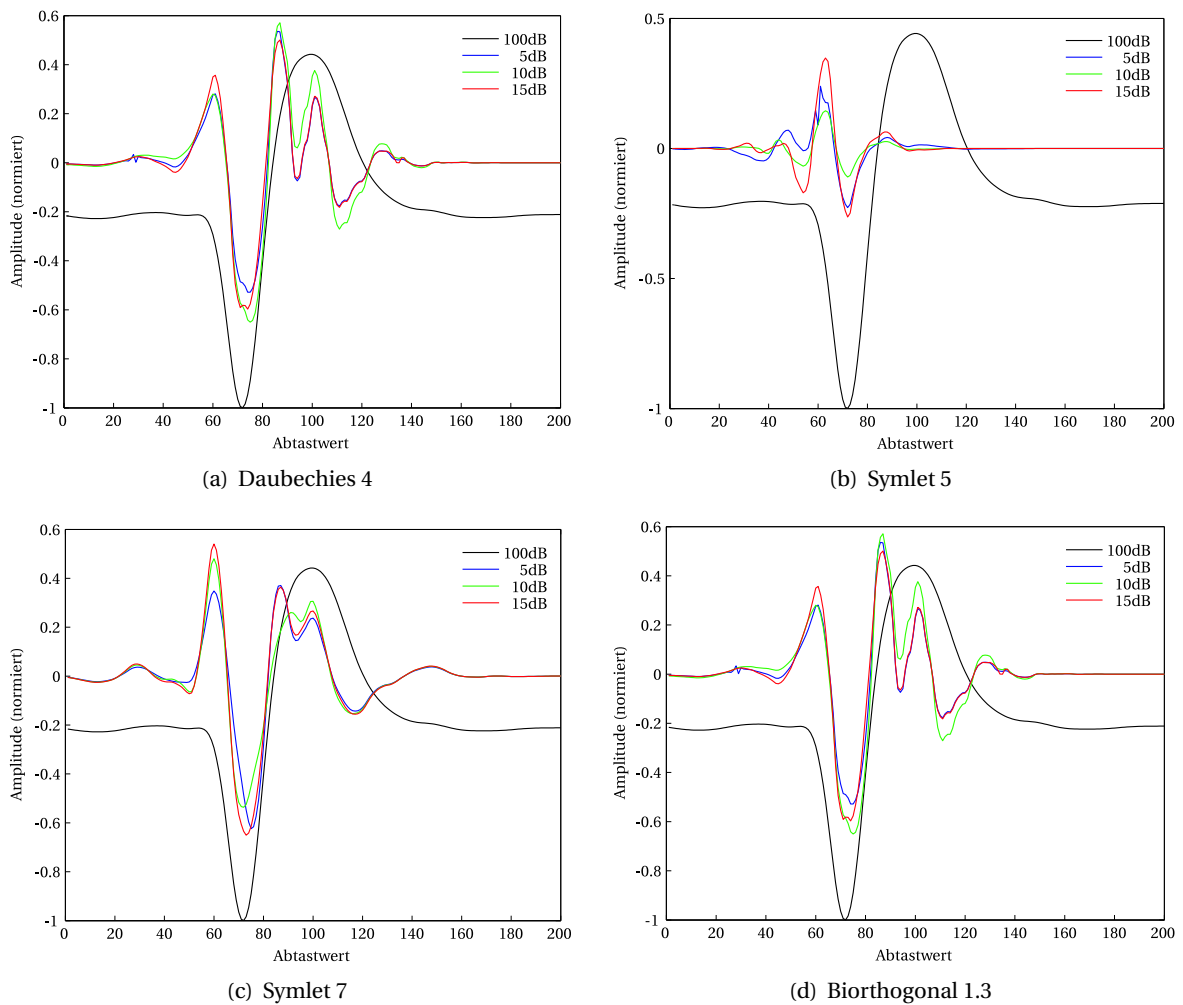


Abbildung 5.6 Visueller Vergleich der Signalverformung mit unterschiedlichen Wavelets beim *Detrending* und *Denoising* (VisuShrink) bei unterschiedlichen Signalrauschabständen.

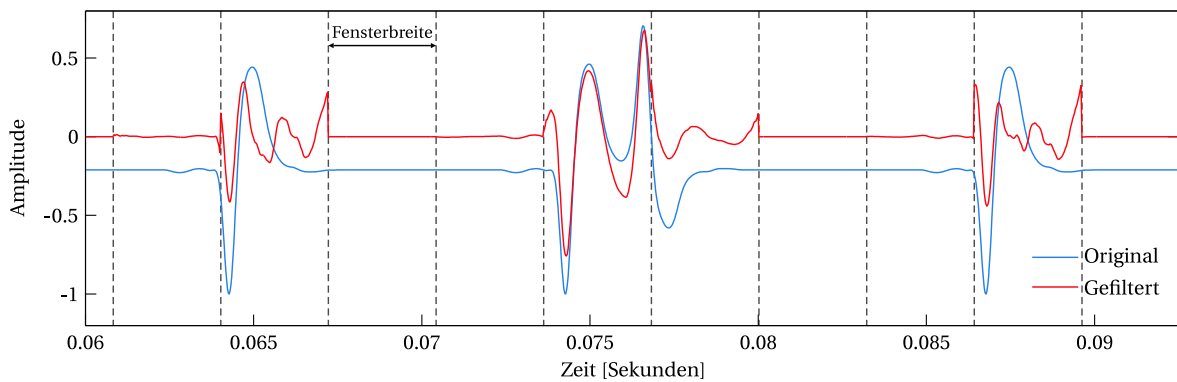


Abbildung 5.7 Vergleich eines ungefilterten (blau) mit einem hochpassgefilterten Signalausschnitt (rot). An den Fensterrändern (vertikale Markierungen) sind deutliche Artefakte infolge einer gefensterten Wavelet-Transformation zu erkennen.

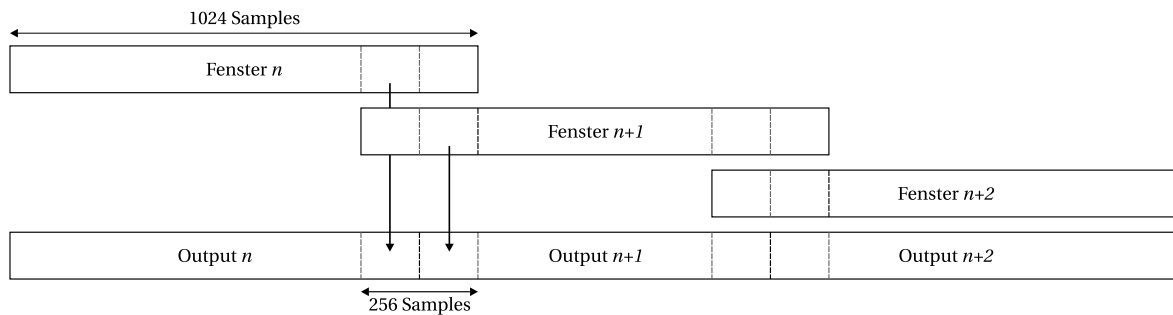


Abbildung 5.8 Redundante Wavelet-Transformation zur Vermeidung von Artefakten beim *Detrending*.

deren Signalmorphologie von Aktionspotenzialen, so dass eine Fehlklassifikation unwahrscheinlich ist. Treten diese Artefakte aber sehr nah oder sogar während eines Aktionspotenzials auf, können sie abhängig von Amplitude und Häufigkeit zu Fehlklassifizierungen führen.

Dazu wird folgender Lösungsansatz vorgeschlagen: Die einzelnen finiten Abschnitte n werden derart gewählt, dass sie reale Werte aus einem vorangegangenen Abschnitt $n - 1$ enthalten, so dass diese nicht von einer (imaginären) Signalerweiterung betroffen sind. Nach anschließender erfolgreicher Koeffizienten-Modifikation und Rücktransformation werden die sich überlagerten Signalabschnitte so ergänzt, dass Randeffekte minimiert werden.

In Abbildung 5.8 ist diese Überlagerung schematisch dargestellt. Die dabei verwendeten Fenster besitzen eine Länge von 1024 Abtastwerten und überlappen mit einem nachfolgenden Fenster um 256 Abtastwerte. Bei der Kombination zweier Fenster werden jeweils 128 Abtastwerte aus vorangegangenen und nachfolgendem Fenster verwendet. Diese Werte wurden für eine Abtastfrequenz von 20 kHz gewählt und müssen für andere Abtastfrequenzen entsprechend angepasst werden.

In Abbildung 5.9 ist das Ergebnis der vorgeschlagenen Lösung sichtbar. Im Vergleich zur normalen DWT mit finiten Signalen werden bei der redundanten DWT Unstetigkeiten an den rot markierten Stellen fast vollständig reduziert.

Für optimale Filterergebnisse sollten jedoch die minimalen Fensterlängen für das jeweilige Basis-

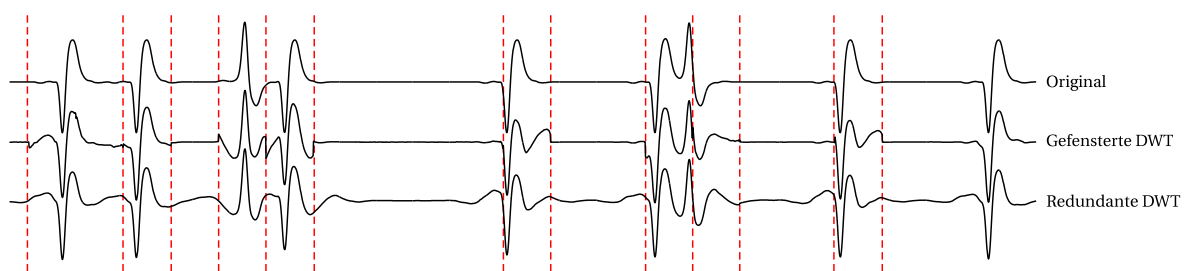


Abbildung 5.9 Vergleich zwischen ungefiltertem sowie gefensterter und redundant gefensterter DWT für das *Detrending*. Die roten Markierungen stellen Fensterbegrenzen dar.

Tabelle 5.1 Minimale Sequenzlängen für ausgewählte Basiswavelets und Zerlegungsstufen.

Basiswavelet	Level 5	Level 6	Basiswavelet	Level 5	Level 6
Daubechies 4	256	512	Symlet 5	512	1024
Daubechies 5	512	1024	Symlet 6	512	1024
Daubechies 6	512	1024	Symlet 7	512	1024
Daubechies 7	512	1024	Symlet 8	512	1024
Daubechies 8	512	1024	Biorthogonal 1.3	256	512
Coiflet 3	1024	2048	Biorthogonal 1.5	512	1024

Wavelet und die entsprechende Frequenzbandanzahl eingehalten werden (siehe Tabelle 5.1).

5.5 Erweitertes Wavelet Denoising

Verschiedene theoretische und praktische Untersuchungen haben gezeigt, dass die diskrete Wavelet-Transformation (DWT) optimale Ergebnisse im Vergleich zu anderen Filterverfahren liefert [169]. Beim adaptiven wavelet-basierten *Denoising* wird ein Signal in unterschiedliche Frequenzbänder zerlegt und Rauschanteile anhand eines statistischen Schätzverfahrens ermittelt [186, 187, 189, 193, 194, 196–198, 328, 329]. Idealerweise erfolgt die Schätzung individuell auf jedem Frequenzband, so dass auch individuelle Störanteile reduziert werden können.

Das in vielen Fällen verwendete Verfahren von Donoho (1995) [170] unterstützt keine frequenzabhängige Modifikation der Wavelet-Koeffizienten. Die Grundannahme für das *VisuShrink*-Verfahren nach [170] basiert auf der breitbandigen additiven Überlagerung von Störsignalen $n(t)$ und Nutzsignalen $s(t)$.

$$x(t) = s(t) + n(t) \quad (5.8)$$

Ziel der wavelet-basierten Filterung ist die stufenweise Zerlegung von $x(t)$ in bandbegrenzte Signale, die in Form von Wavelet-Koeffizienten vorliegen und eine Korrelation zwischen den im Signal enthaltenen Frequenzen und des Wavelets darstellen. Idealerweise werden durch die Filterbank die einzelnen Signalbestandteile getrennt und durch individuelle Koeffizienten in verschiedenen Frequenzbändern repräsentiert. Ist bekannt, in welchem Frequenzband überwiegend Störanteile vorhanden sind, können die Koeffizienten c_i zur Berechnung des Schätzwerts σ_{noise} verwendet werden. Ein optimaler Wert wird anhand Gleichung 5.9 ermittelt, in der c_i die Wavelet-Koeffizienten eines beliebigen Frequenzbandes i darstellen [170].

$$\sigma_{\text{noise}} = \frac{\text{median}(|c_i|)}{0.6745} \quad (5.9)$$

σ_{noise} wird in Gleichung 5.10 zur Berechnung eines Schwellwertes T_{noise} genutzt, der zur Modifikation aller Koeffizienten mittels *soft threshold* dient.

$$T_{\text{noise}} = \sigma_{\text{noise}} \sqrt{2 \ln(N)} \quad (5.10)$$

Wendet man das Verfahren zur Abschätzung von σ_{noise} auf jedes beliebige Frequenzband an, fließen gleichermaßen Koeffizienten des Nutzsignals in die Berechnung für σ_{noise} ein, wodurch sich höhere Beträge ergeben. Bei der Modifikation der Koeffizienten mittels *soft threshold* werden damit auch Koeffizienten der Frequenzanteile von Nutzsignalen stärker reduziert. Die Folge sind sehr stark gedämpfte Aktionspotenziale.

Mit dem nachfolgend vorgestellten Verfahren ist es möglich, die einzelnen Rauschanteile aus jedem Frequenzband abzuschätzen, um damit eine individuelle Modifikation der Wavelet-Koeffizienten zu realisieren. Störfrequenzen werden deutlich reduziert, Frequenzanteile von Aktionspotenzialen bleiben erhalten. Durch eine adaptive Anpassung der einzelnen Störkoeffizienten werden mit dem neuen Verfahren auch instationäre Rauschanteile erkannt und entfernt.

Während beim *VisuShrink*-Verfahren davon ausgegangen wird, dass Nutz- und Störsignale kontinuierlich vorhanden sind, wird bei dem neuen Verfahren das zeitlich begrenzte Auftreten von Aktionspotenzialen ausgenutzt. Dabei gilt die Annahme, dass Störanteile im gesamten Beobachtungszeitraum vorhanden sind. Bei Signalabschnitten zwischen zwei Aktionspotenzialen kann man Koeffizienten aller Frequenzbänder zur Abschätzung eines besseren Rauschmodells verwenden, das in Phasen mit Aktionspotenzialen zur breitbandigen Entstörung eingesetzt wird.

In Abbildung 5.10 ist der Ablauf des als *Enhanced Wavelet Denoising* (EWD) bezeichneten Verfahrens dargestellt. Zum Zwecke einer kontinuierlichen Signalverarbeitung werden nur finite Signalabschnitte mit n Abtastwerten verarbeitet. Jeder dieser Signalabschnitte wird mit einem *Spike Activity Detector* (SAD) auf das Vorhandensein von Aktionspotenzialen untersucht. Dafür können beispielsweise der *Teager Energy Operator* (TEO) [214], das k -TEO-Verfahren [216] oder morphologische Filter [226, 227] eingesetzt werden. Der *Teager Energy Operator* kann Aktionspotenziale in einem Signal mit einem Signalrauschabstand von unter 0,8 dB mit einer Fehlerrate von 10 % erkennen [70].

Wird vom SAD in einer Sequenz kein Aktionspotenzial detektiert, so kann davon ausgegangen werden, dass dieser Signalabschnitt nur aus Rauschanteilen besteht. Dieser Abschnitt wird mittels diskreter Wavelet-Transformation in Wavelet-Koeffizienten transformiert. Aus den Absolutwerten der Koeffizienten c_i der einzelnen Frequenzbänder wird ein Mittelwert bestimmt (Gleichung 5.11), der als Schätzwert \hat{c}_i für den Störanteil dieser Sequenz dient.

$$\hat{c}_i = \text{mean}(|c_i|) = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n |c_i| \quad (5.11)$$

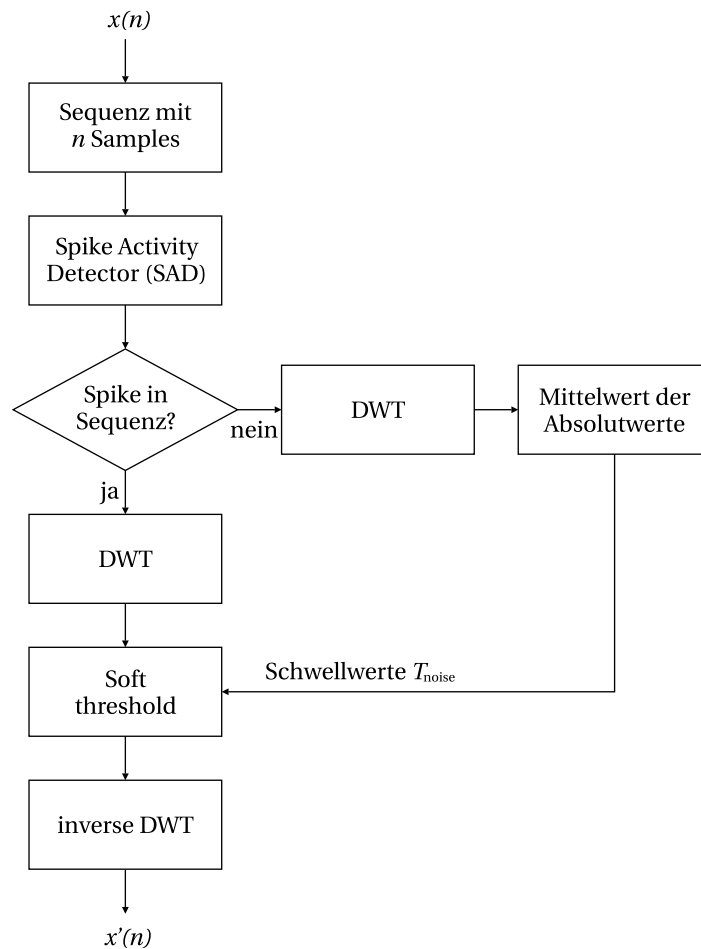


Abbildung 5.10 Programmablaufplan des *Enhanced Wavelet Denoising*.

Um eine Robustheit gegenüber schnellen Störsignaländerungen zu gewährleisten, erfolgt eine adaptive Anpassung des Mittelwerts der Störkoeffizienten zwischen den untersuchten Sequenzen anhand eines Lernfaktors η (Gleichung 5.12).

$$\Delta T_{\text{noise}}(\hat{c}_i) = \eta [\text{mean}(|c_i|) - T_{\text{noise}}(\hat{c}_i)] \quad (5.12)$$

Wird dagegen in einem Signalabschnitt mittels SAD ein *Spike* erkannt, erfolgt auf Basis der adaptierten Störkoeffizienten c_i eine Modifikation der Koeffizienten durch *soft threshold*. In Abbildung 5.11 ist dieser Vorgang bildlich dargestellt.

In Abbildung 5.12 wird dieser Filtervorgang visuell dargestellt. Der blaue Kurvenverlauf steht für ein real abgeleitetes Signal, das von einem unbekanntem Rauschanteil überlagert wird. Der rote Kurvenverlauf stellt das mittels *VisuShrink* entstörte Signal dar. Ein Unterschied zwischen dem Rauschanteil des Originalsignals ist bereits erkennbar. Der grüne Signalverlauf wurde durch Entstörung mithilfe des *Enhanced Wavelet Denoising* realisiert. Im Vergleich zum *VisuShrink*-Verfahren konnte der Rauschanteil stärker reduziert werden.

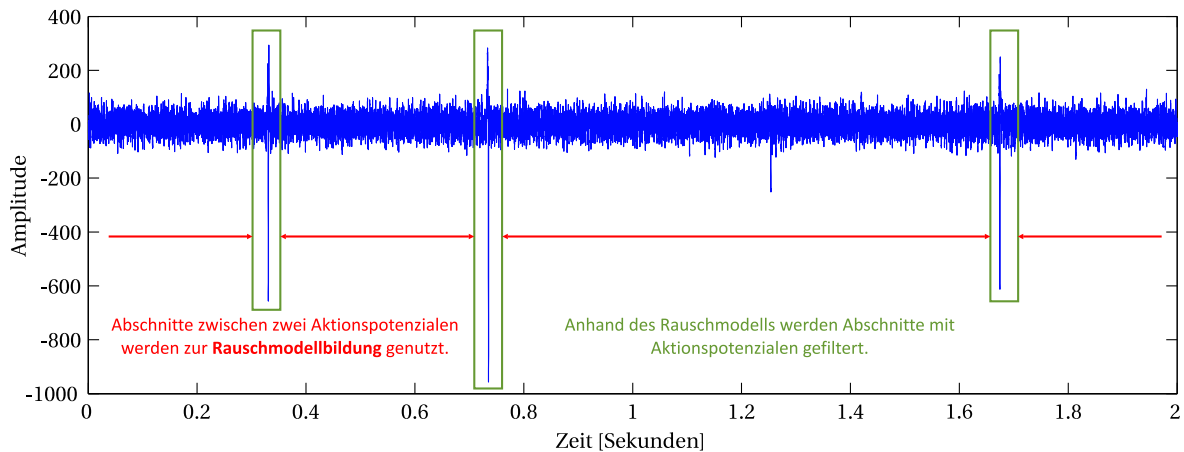


Abbildung 5.11 Zwischen zwei Aktionspotenzialen werden Koeffizienten zur adaptiven Schätzung des Störanteils verwendet und bei Sequenzen mit Aktionspotenzialen zur Entstörung genutzt.

In Abbildung 5.13 sind die Spektren von real abgeleiteten Originalsignalen (blau), mittels *VisuShrink* (rot) sowie *Enhanced Wavelet Denoising* (grün) gefilterten Signalen dargestellt. Das grün dargestellte Spektrum zeigt eine deutliche Reduzierung der Störanteile im Vergleich zum roten Spektrum. Besonders im oberen Frequenzbereich konnte dadurch eine weitere Reduzierung der Störanteile gelingen.

Das beschriebene Prinzip ist für die aktuell verwendete Generation von Multielektroden-Arrays konzipiert. Die räumliche Auflösung der Sensoren ist geringer als die Auflösung eines neuronalen Netzes. Gelingt es, Sensormatrizen mit einer sehr hohen Auflösung zu etablieren, kann das beschriebene Verfahren noch erweitert werden.

In Abbildung 5.14 werden zur Signalfilterung Referenzelektroden auf der Sensormatrix eingesetzt, die sich in unmittelbarer Nachbarschaft zu einem Primärsensor befinden. Kann die Auflösung der Sensoren im Vergleich zur Auflösung von Neuronen deutlich gesteigert werden, ist anzunehmen,

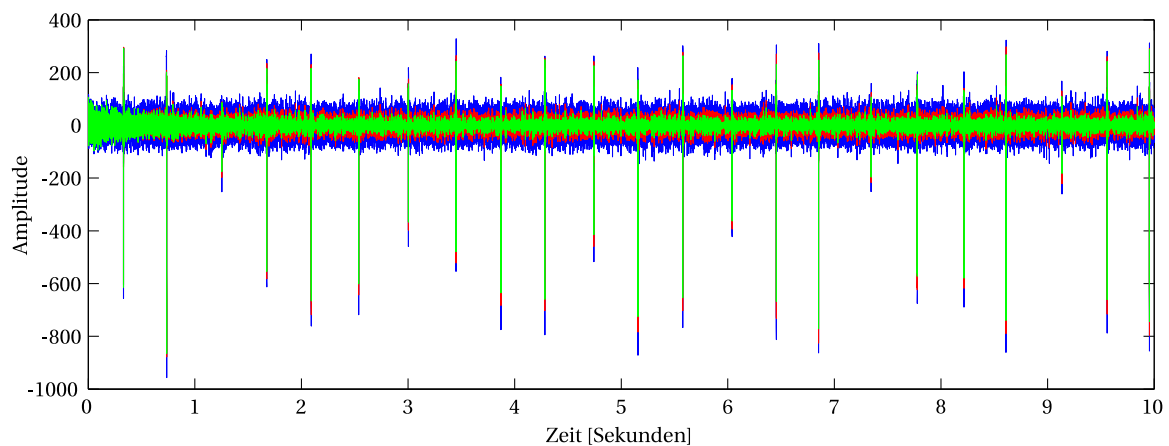


Abbildung 5.12 Vergleich zwischen Originalsignal (blau), mittels *VisuShrink* (rot) und *Enhanced Wavelet Denoising* (grün) entstörtem Signal.

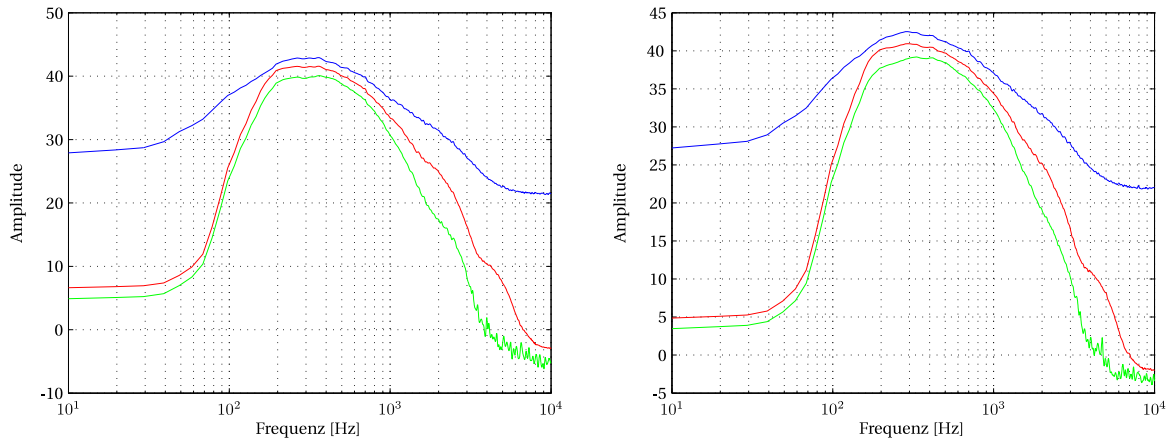


Abbildung 5.13 Vergleich der Spektren des ungefilterten Originalsignals (blau), des mittels *VisuShrink* (rot) und *Enhanced Wavelet Denoising* (grün) gefilterten Signals für zwei unterschiedliche reale Signale.

dass nicht alle Sensoren Kontakt mit Neuronen haben und diese nur Störsignale ableiten. Ob ein in Nachbarschaft befindlicher Sensor Kontakt mit einem oder mehreren Neuronen hat, lässt sich durch einen *Spike Activity Detector* feststellen. Ist dies nicht der Fall, können die Sensoren als Referenzsensor zur Modellierung der lokalen Rauschanteile verwendet werden.

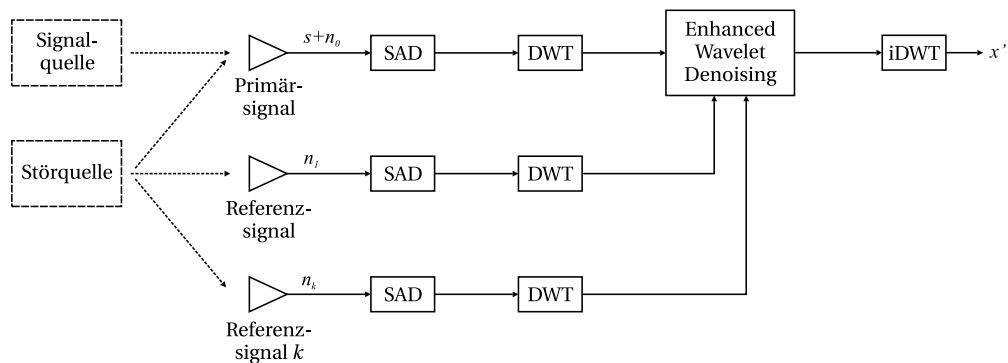


Abbildung 5.14 Erweiterung von *Enhanced Wavelet Denoising* für hochauflösende Multielektroden-Arrays.

5.6 Adaptives Verfahren zur Merkmalsextraktion

Die erkannten Aktionspotenziale im Signalverlauf liegen aus vorangegangener Bearbeitung in extrahierter Form vor und sollen nachfolgend anhand gemeinsamer Merkmale gruppiert werden. Dazu ist es notwendig, Merkmale aus den Kurvenverläufen zu extrahieren. Klassischerweise wird dafür die Hauptkomponentenanalyse (PCA, engl. *principal component analysis*) genutzt. Die PCA ist ein statistisches Verfahren, das die Kovarianzstruktur multivariater Daten dekorreliert. Durch die Transformation vom Datenraum in einen Merkmalsraum lassen sich mithilfe weniger Komponenten wesentliche Informationen aus einem Signalverlauf abbilden [333]. Das PCA-Verfahren kann

zur Datenreduktion oder zur Gruppierung von Daten eingesetzt werden.

Das Verfahren wird hauptsächlich dann eingesetzt, wenn endliche Datensätze mit geringer Dimension verarbeitet werden sollen. Die Verwendung bei der Verarbeitung neuronaler Signale gestaltet sich dagegen schwieriger, da es sich hierbei meist um sehr lange Datensätze handelt und deshalb sehr viel Speicher notwendig ist. Bei der Ableitung von 64 Kanälen mit einer Abtastfrequenz von 20 kHz entstehen etwa 1,8 MB an Daten pro Sekunde, wobei sich Langzeitmessungen über Tage und Wochen erstrecken können. Zudem lässt sich die PCA aufgrund von Matrizenoperationen nur bedingt in Echtzeitsystemen verwenden.

Das nachfolgend untersuchte Verfahren basiert auf einem neuronalen Netzwerk, mit dessen Hilfe Merkmale iterativ extrahiert werden können. Neben einer schnelleren Verfügbarkeit der Merkmale für weitere Untersuchungen ist darüber hinaus ein deutlich geringerer Speicherbedarf für die Verarbeitung notwendig, da einzelne Merkmale eines Aktionspotenzials sofort bestimmt und ohne Zwischenspeicherung weiterverarbeitet werden können. Zur weiteren Analyse werden bis zu drei Merkmale und der zugehörige Zeitstempel, bei dem dieses Aktionspotenzial detektiert wurde, benötigt. Im Vergleich zum ursprünglich extrahierten Signalausschnitt, der abhängig von der Abtastfrequenz aus bis zu 32 Abtastwerten bestehen kann, wird durch eine Merkmalsextraktion eine deutliche Datenreduktion erzielt, die sich bei der Verarbeitung vieler Sensordaten positiv auf die Verarbeitungsgeschwindigkeit auswirkt. In [234] konnte nachgewiesen werden, dass die ersten drei Merkmale ca. 80 % der Signalenergie beinhalten und damit für eine weitere Verarbeitung ausreichend sind.

Das Verhalten selbst organisierender neuronaler Netze ist dem der Hauptkomponentenanalyse sehr ähnlich, da ihr Gewichtsvektor ω in Richtung globaler Eigenwerte konvergiert [334]. Lineare Neuronen erster Ordnung können deshalb als Merkmalsextraktor eingesetzt werden [335].

Ein einfaches lineares Neuron (vgl. Abbildung 5.15) besteht aus m Eingängen x_i mit $i = 1 \dots m$. Der Ausgangswert y eines Neurons (Gleichung 5.13) ergibt sich aus der Linearkombination der Eingangswerte x_i und ihren Wichtungen ω_i [336].

$$y = \sum_{i=1}^m \omega_i x_i \quad (5.13)$$

Entsprechend der Hebb'schen Lernregel [337] erfolgt eine Anpassung des Wichtungsvektors anhand der Ein- und Ausgangswerte sowie unter Zuhilfenahme eines Lernfaktors η . Aus Gleichung 5.14 ist erkennbar, dass Wichtungen ω_i , deren Eingangswerte x_i über eine hohe Korrelation mit dem Ausgangswert y verfügen, stärker wachsen als jene mit geringerer Korrelation zwischen x_i und y . Große Eingangswerte auf ein und demselben Eingang x_i besitzen deshalb einen hohen Einfluss auf den Ausgangswert y eines Neurons.

$$\omega_i(n+1) = \omega_i(n) + \eta y(n) x_i(n) \quad (5.14)$$

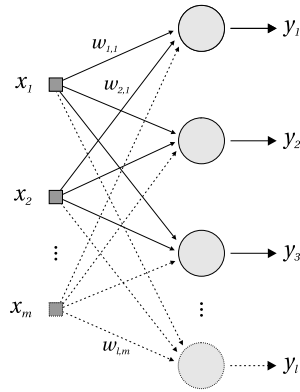


Abbildung 5.15 Einfaches lineares neuronales Netz zur Extraktion von Hauptkomponenten.

Die Verwendung der einfachen Lernregel aus Gleichung 5.14 kann bei einer großen Anzahl an Eingangswerten ohne Normierung zur Konvergenz im Unendlichen führen. Zudem kann mit einem einzelnen linearen Neuron lediglich die erste Hauptkomponente bestimmt werden, weshalb dieses Konzept durch Sanger (1989) [338] für eine beliebiger Anzahl j an Merkmalen sowie zur Normierung der Ausgangswerte erweitert wurde (Gleichung 5.15 und 5.16).

$$y_j(n) = \sum_{i=1}^m \omega_{j,i}(n) x_i(n) \quad (5.15)$$

$$\omega_{j,i}(n+1) = \omega_{j,i}(n) + \eta \left[y_j(n) x_i(n) - y_j(n) \sum_{k=1}^j \omega_{k,i}(n) y_k(n) \right] \quad (5.16)$$

Um dieses Verfahren für neuronale Signale zur analysieren, wurden zwei künstliche Signale generiert, die aus zwei bzw. drei unterschiedlichen *Units* bestehen. Mit Hilfe der klassischen und der neuronalen PCA sollen aus beiden Signalen jeweils zwei Merkmale mit der größten Varianz berechnet werden. Diese Merkmale werden jeweils in einer zweidimensionalen Darstellung grafisch gegenüber gestellt, um zu überprüfen, ob die neuronale PCA im Vergleich zur klassischen PCA identische Cluster bestimmt.

In Abbildung 5.16 ist das Ergebnis von zwei unterschiedlichen *Units* jeweils für die klassische (linke Abbildung) und neuronale (rechte Abbildung) Hauptkomponentenanalyse dargestellt. In beiden Fällen sind die zu erwartenden zwei Cluster erkennbar. Aufgrund der Verwendung eines künstlich erzeugten Signals ist die Quelle des jeweiligen Aktionspotenzials bekannt, so dass Merkmale aus *Unit 1* in blau und Merkmale aus *Unit 2* in rot dargestellt werden. In beiden Fällen ist eine richtige Zuordnung zum jeweiligen Cluster erkennbar, da Merkmale mit gleicher Farbgebung Gruppen bilden.

In Abbildung 5.17 wurden Merkmale aus drei unterschiedlichen *Units* mit Hilfe der klassischen (linke Abbildung) und neuronalen (rechte Abbildung) extrahiert. Auch hier ist eine korrekte Clustering der drei farblich markierten *Units* erkennbar.

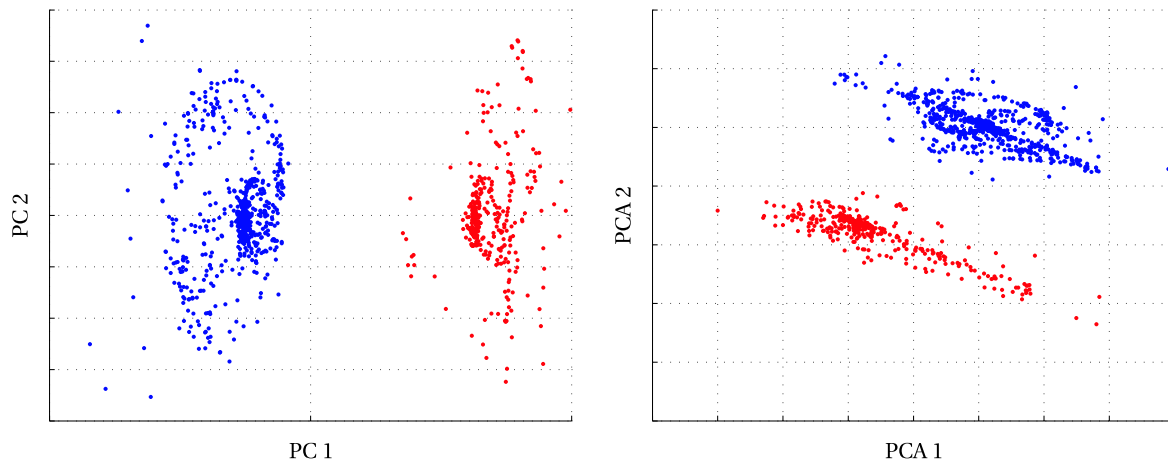


Abbildung 5.16 Visueller Vergleich der Merkmalsextraktion zwischen klassischer (links) und neuronaler (rechts) PCA eines künstlich erzeugten Signals bestehend aus zwei *Units*.

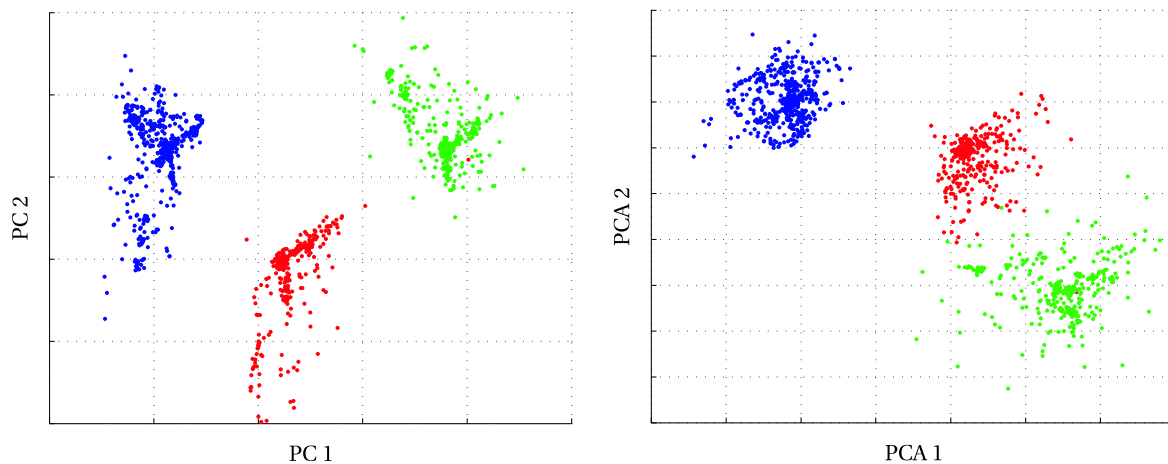


Abbildung 5.17 Visueller Vergleich der Merkmalsextraktion zwischen klassischer (links) und neuronaler (rechts) PCA eines künstlich erzeugten Signals bestehend aus drei *Units*.

Anhand der Verwendung künstlicher Signale, bei denen die Ursprungsunit bekannt ist, ist erkennbar, dass das neuronale Verfahren zur Extraktion von Merkmalen sowohl die korrekte Anzahl an *Units* als auch deren Zuordnung ermittelt. Im direkten Vergleich mit der klassischen Hauptkomponentenanalyse sind unter diesen Gesichtspunkten keine Unterschiede feststellbar.

In Abbildung 5.18 wurden die mittels klassischer (links) und neuronaler (rechts) PCA extrahierten Merkmale vier unterschiedlicher realer Datensätze dargestellt. Aufgrund der unbekannt Anzahl der vorhandenen *Units* kann hierbei keine Einfärbung realer Cluster erfolgen. Deutlich ist dennoch bei beiden Verfahren eine Trennung der Cluster erkennbar.

Obwohl die mittels neuronaler PCA erzeugten Cluster auf der rechten Seite nahezu identisch mit denen auf der linken Seite sind, ist im Vergleich zur klassischen PCA meist eine weniger eindeutige Trennung erkennbar. Die Ursache dafür liegt im iterativen Prozess der neuronalen PCA

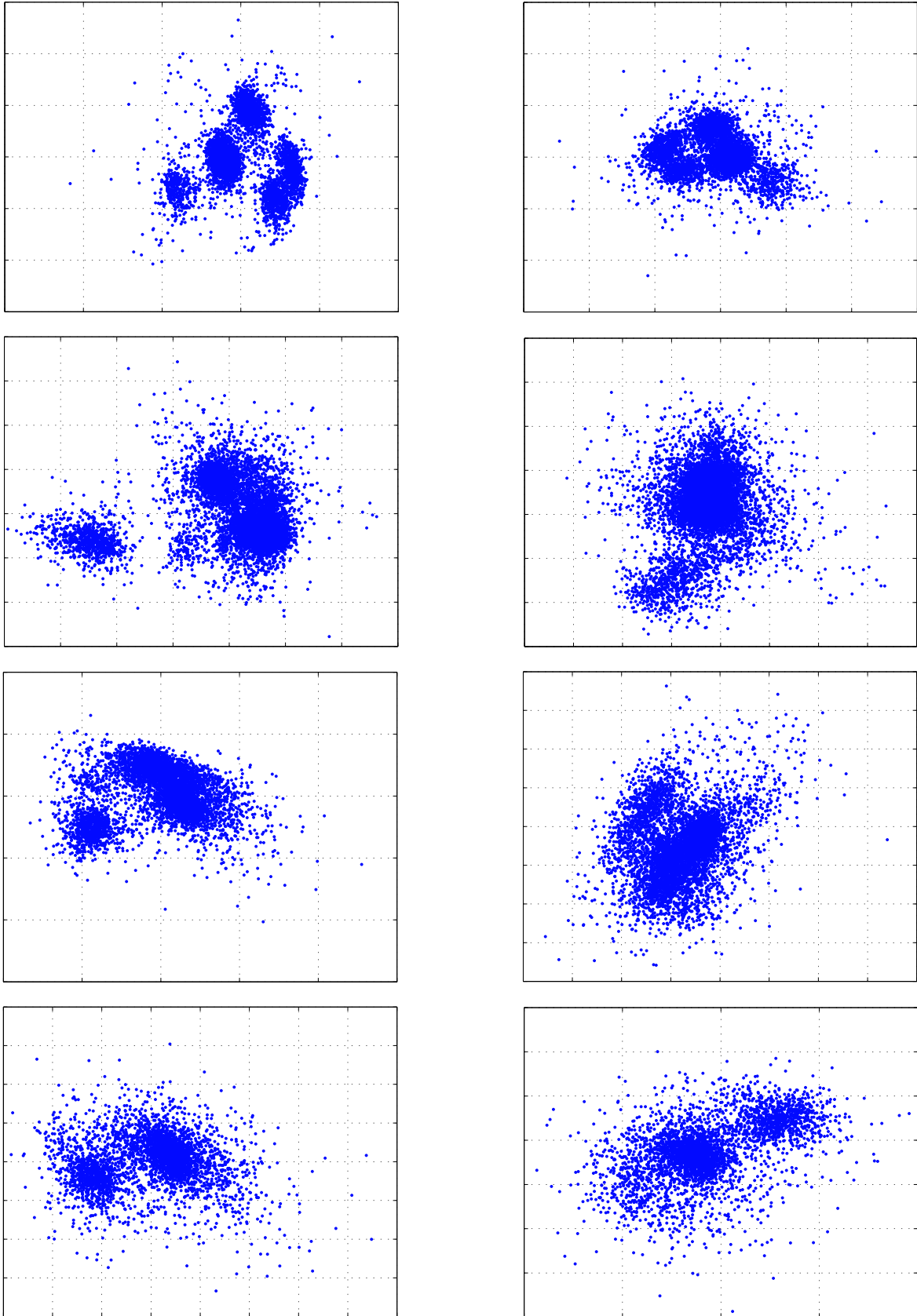


Abbildung 5.18 Vergleich zwischen Offline-PCA (linke Spalte) und Online-PCA (rechte Spalte) für vier unterschiedliche Sensoren bei realen Daten.

begründet.

Eine grafische Darstellung der Merkmale aus der gesamten Messung birgt hierbei die Gefahr, dass „wandernde“ Cluster im Verlauf einer Messung mit anderen Clustern überlappen. Durch Bewegung von Neuronen auf einem Sensor kommt es zur Veränderung der Signalform und dadurch auch zur Verschiebung von Merkmalen. Mit der klassischen PCA sind diese Merkmalsveränderungen kaum detektierbar. Die neuronale PCA hingegen ermöglicht durch Entfernung älterer Merkmale (aus der Darstellung) eine kontinuierliche Anpassung an sich ändernde Merkmale sowie deren Cluster.

Durch den Vergleich mittels künstlicher und realer Daten konnte nachgewiesen werden, dass die neuronale PCA sowohl die richtige Anzahl an Clustern ermittelt, als auch eine korrekte Gruppierung gleicher Eigenschaften erzielt. Der Vorteil gegenüber der klassischen PCA liegt in einem geringeren Speicherbedarf und in einer deutlich schnelleren Verfügbarkeit der Merkmale für weitere Analyseschritte.

Aufgrund ihrer iterativen Arbeitsweise gelingt es, Veränderungen von Merkmalen aufgrund von Bewegungen bei Neuronen auf der Sensoroberfläche zu erkennen und zu berücksichtigen. Darüber hinaus fallen durch die adaptive Berechnung der Merkmale Datensätze mit kurzzeitigen Abweichungen infolge von Störeinflüssen kaum ins Gewicht, weshalb dieses Verfahren robuster gegenüber Störungen ist.

5.7 Clusteranalyse extrahierter Merkmale

Im vorherigen Verarbeitungsschritt, der Merkmalsextraktion, wurden bereits Merkmale in einem zweidimensionalen Diagramm dargestellt, so dass Aktionspotenziale aus dem gleichen Neuron eine Anhäufung von Punkten im selben Diagrammbereich bilden. Die unterschiedlich starken Streuungen sind dabei den Störungen geschuldet. Im finalen Verarbeitungsschritt soll mit Hilfe der Clusteranalyse eine Gruppierung der Daten erfolgen, wobei Punktwolken mit einer hohen Dichte einem bestimmten Neuron zugeordnet werden können. Primäres Ziel ist dabei ein automatisches Auffinden der Gruppen, weshalb nur unüberwachte Verfahren untersucht werden sollen.

Eine sehr einfache Methode, Stichproben ihren natürlichen Clustern zuzuordnen, wurde bereits in Abschnitt 3.4 beschrieben. Das als k -means bekannte Verfahren ist ein zentrumsbasierter Clusteralgorithmus, bei dem n Stichproben x_i mit $i = 1 \dots n$ anhand eines Kriteriums jeweils einem Zentrum c_j mit $j = 1 \dots k$ zugeordnet werden. Das Kriterium bei k -means ist der minimale Abstand einer Stichprobe x_i zu einem Zentrum c_j entsprechend Gleichung 5.17.

$$\text{KM} = \sum_{i=1}^n \min_{j \in \{1 \dots k\}} \|x_i - c_j\|^2 \quad (5.17)$$

So mathematisch einfach dieses Verfahren ist, besitzt es für den Einsatz beim *Spike sorting* zwei entscheidende Nachteile. Der erste Nachteil besteht in der manuellen Vorgabe der Anzahl k an Clustern, zu denen die Stichproben x_i anhand des Abstandskriteriums eingeordnet werden. Eine Bestimmung von k anhand statistischer Werte ist beim k -means nicht möglich und damit auch kein automatisches Clustern. Zudem erfolgt die Anfangsplatzierung der Cluster c_j anhand zufälliger Werte und kann einen sehr großen Einfluss auf Störungen und die Leistungsfähigkeit des Algorithmus haben [339]. Der zweite Nachteil ist der rechnerische Aufwand für das Clustern großer Datensätze. Nach der Zuordnung einer Stichprobe x_i zu einem Cluster c_j muss jeweils der neue Mittelpunkt μ_j des jeweiligen Clusters bestimmt werden. Mit steigender Anzahl an Stichproben wächst damit automatisch der Berechnungsaufwand.

Diese Nachteile führten zur Entwicklung von x -means [339]. Dieses Verfahren zur Clusterung von Daten basiert zwar auf dem k -means-Verfahren, bestimmt und optimiert aber unter Zuhilfenahme weiterer Kriterien automatisch die Anzahl der Cluster k . Eine weitere Optimierung führt dazu, dass große Datensätze effizienter geclustert werden und somit im Vergleich zu k -means weniger Berechnungsaufwand notwendig ist.

x -means startet mit einem minimalen Wert für k und ermittelt die Zugehörigkeit der Stichproben anhand des Abstandskriteriums. Anschließend wird jedes lokale Cluster in zwei Untercluster ($k = 2$) geteilt, wobei die neuen Clustermittelpunkte proportional vom ursprünglichen Cluster entfernt platziert werden. Durch die Berechnung des Bayesschen Informationskriteriums (BIC) wird entschieden, ob die neu eingefügten Cluster zur Verbesserung der Clusterstruktur führen [339]. Wenn dies nicht der Fall ist, werden die Untercluster wieder entfernt.

In Abbildung 5.19 wurden mit Hilfe künstlicher Daten sowie dem in Abschnitt 5.6 beschriebenen Verfahren jeweils zwei Datensätze mit zwei bzw. drei *Units* erzeugt. Mit Hilfe von x -means wurden exemplarisch in allen vier Fällen die richtige Anzahl an Clustern bestimmt. Die rot dargestellten Werte bilden den jeweiligen Mittelpunkt eines Clusters. Sind die Anzahl und Mittelpunkte der Cluster bekannt, können Merkmale mit einer entsprechenden Abstandsmetrik einem Cluster und damit einer *Unit* zugeordnet werden.

5.8 Zusammenfassung

In Kapitel 5 erfolgte die Analyse von Arbeitsschritten, die beim *Spike sorting* bisher entweder nur *offline* oder durch teilweise manuell ausgewählte Parameter realisiert werden konnten. Diese Arbeitsschritte sind i) die Filterung des Eingangssignals, ii) die Extraktion von Merkmalen und iii) die Clusterung ähnlicher Merkmale.

Für die Filterung des Eingangssignals besitzt die diskrete Wavelet-Transformation aufgrund ihrer mathematischen Effizienz und ihren besseren spektralen Analyse-Eigenschaften gegenüber klassischen FIR-Filtern deutliche Vorteile. Zudem kann die spektrale Zerlegung zum einen zur

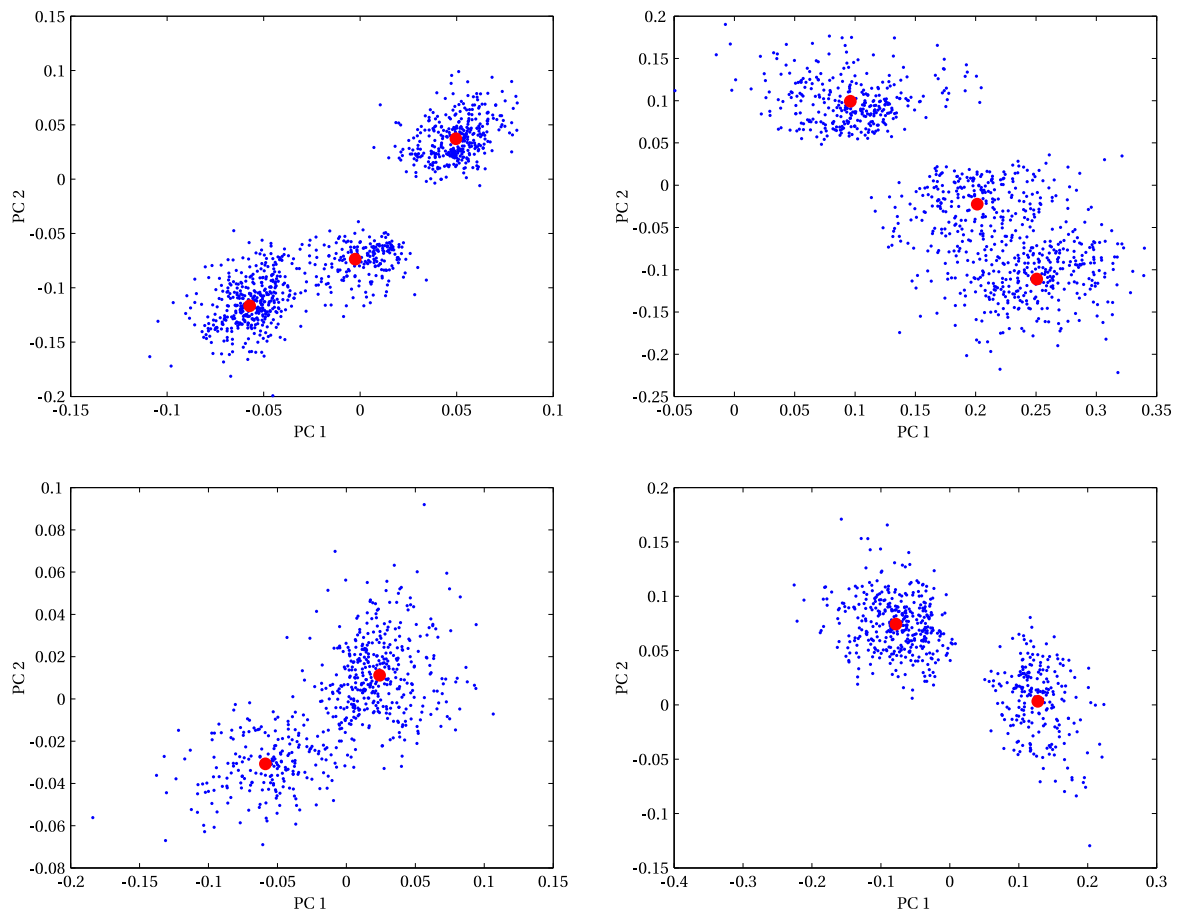


Abbildung 5.19 Automatische Bestimmung der Anzahl der Cluster mit x -means für drei (obere Zeile) bzw. zwei Cluster (untere Zeile).

effizienten Analyse der Rauscheigenschaften und zum anderen zur gezielten Manipulation ausgewählter Frequenzbereiche eingesetzt werden. Voraussetzung dafür ist die Wahl eines geeigneten Wavelets, welche gleiche oder ähnliche spektrale Eigenschaften wie die zu analysierenden Zielfrequenzen aufweisen. Anhand von Beispielsignalen wurden die Filtereigenschaften mittels zweier Messmethoden von 12 unterschiedlichen Basis-Wavelets gegenübergestellt und deren Performance verglichen.

Bei der Verarbeitung endlicher Signalausschnitte kommt es an den Grenzen bei der Filterung mittels Wavelets zu starken Signalverzerrungen und Artefakten, die bei der weiteren Auswertung zu höheren Fehlerraten führen. Dafür werden in der Literatur verschiedene Formen der Signalerweiterung vorgeschlagen. Bei dynamischen Signalen erzielen jedoch auch diese Signalerweiterungsverfahren nur bedingte Verbesserungen. Als Alternative wurde ein Verfahren vorgeschlagen, dass nicht auf der künstlichen Erweiterung der Signale beruht, sondern überlappende Signale verwendet. Diese Form der Signalerweiterung erhöht zwar die Redundanz bei der Berechnung der Wavelet-Koeffizienten, führt aber im Vergleich zu herkömmlichen Erweiterungsmethoden zu deutliche geringeren Artefakten und verringert damit die Fehlerrate aufgrund falsch erkannter Spikes (*false negatives*).

Einen weiteren Untersuchungsschwerpunkt stellt die Filtermethode dar. Klassischerweise wird das Eingangssignal mittels Wavelet-Transformation in mehrere spektrale Komponenten zerlegt, wobei eine Rauschminderung anhand fixer Parameter und spektraler Bänder erfolgt. Abgeleitete Signale besitzen jedoch eine sehr hohe Dynamik und Komplexität in Hinblick auf ihre Amplitude und den auftretenden Frequenzbereichen von Stör- als auch Nutzsignalen. Durch eine ungeeignete Wahl von fixen Parametern für die Eingangsfilerstufen können unter bestimmten Voraussetzungen die falschen oder zu wenig Frequenzbereiche gedämpft werden. Als Alternative werden hierfür zwei Verfahren vorgestellt. Das erste Verfahren basiert auf der Annahme, dass Störsignale quasistationär während des gesamten Signalverlaufs vorhanden sind; Aktionspotenziale jedoch nur in diskreten Zeiträumen auftreten. Lässt man das Filter auf mehreren spektralen Bändern zwischen den Aktionspotenzialen die Rauscheigenschaften adaptieren und deaktiviert die Adaption während eines Aktionspotenzials, können deutlich mehr Störanteile entfernt werden.

Das zweite Verfahren nutzt die vorhandenen Sensoren auf einem MEA als Referenzsignal. Während bisher Sensoren auf einem MEA als isoliert betrachtet wurden, können benachbarte Sensoren zur Rauschanalyse und -minderung eingesetzt werden. Dabei wird angenommen, dass ein Großteil auftretender Rauschsignale global von allen Sensoren abgeleitet werden. Wird von einem Sensor ein Aktionspotenzial abgeleitet, so können die Rauschsignalanteile aus benachbarten Sensoren zur Filterung verwendet werden.

Einen dritten Untersuchungsschwerpunkt stellt die Separation bzw. Extraktion von Merkmalen dar, die für die Clusterung bzw. Klassifikation notwendig sind. Klassischerweise wird dazu die Hauptkomponentenanalyse (engl. PCA) eingesetzt. Diese benötigt jedoch eine sehr große Anzahl

an Stichproben, um Merkmale zu extrahieren und eignet sich deshalb nur bedingt zur Online-Analyse. Als Alternative wurde ein neuronales Netz untersucht, welches in der Lage ist, ebenfalls die Hauptkomponenten des Eingangssignals zu extrahieren. Im Unterschied zur klassischen PCA erfolgt die Berechnung adaptiv und passt sich mit jeder Stichprobe an. Daraus ergibt sich ein weiterer und nicht unwesentlicher Vorteil gegenüber dem *Offline*-Verfahren: Ändert sich die Lage der Neuronen zum Sensor im zeitlichen Verlauf, passen sich die extrahierten Merkmale kontinuierlich an, wobei ältere Merkmale langsam verschwinden. Bei der *Offline*-Berechnung mittels klassischer PCA können sich große und überlappende *Cluster* bilden, deren Grenzen nur sehr schwer erkennbar sind und selbst bei einer manuellen Clusterung Probleme bei der Separation bilden.

Einen letzten Untersuchungsschwerpunkt stellt die Clusteranalyse dar. Bisher wurden keine Verfahren für eine vollständig automatisierte Clusteranalyse gefunden. Den besten Ansatz stellte bisher ein Verfahren dar, welches als *k*-means bezeichnet wird. Dieses Verfahren findet Cluster anhand einer vorgegebenen Anzahl. Die tatsächliche Anzahl an abgeleiteten Signalen ist jedoch vorher nicht bekannt und kann sich während einer Messung ändern. Das untersuchte Verfahren *x*-means verwendet zusätzliche Kriterien, die eine dynamische und automatische Bestimmung von *k* ermöglicht.

6 Bewertung und Diskussion

Die zunehmende Erhöhung von Sensoren auf einem Multielektroden-Array und die damit einhergehende Zuwachsrate an simultan abgeleiteten Signalen führt dazu, dass sie in manueller Form nur noch mit sehr hohem Aufwand auswertbar sind. Für einen optimalen Einsatz der MEA-Technologie spielt der Faktor Zeit und ein hoher Grad an Automatisierung der Einzelabläufe eine wichtige Rolle. Die abgeleiteten Signale sollen möglichst in Echtzeit verarbeitet werden, so dass Ereignisse in den einzelnen Zellen unmittelbar nach ihrem Auftreten zur weiteren Analyse zur Verfügung stehen. Zum anderen wird die Weiterentwicklung von Sensorarrays durch die nur teilweise automatischen Signalauswerte- und analyseverfahren gebremst. Sofern die momentan eingesetzten Methoden weiterhin manuelle Verarbeitungsschritte zur Signalanalyse benötigen, ist davon auszugehen, dass durch die verfügbaren 64- bzw. 128-Sensor-Systeme die Grenze der manuellen Signalanalyse erreicht ist. Um die Vorteile der MEA-Technologie effizient ausnutzen zu können und deren Weiterentwicklung voranzutreiben, ist eine vollständig automatisierte Signalverarbeitungskette notwendig.

In dieser Arbeit wurden deshalb aktuelle Verfahren zur Filterung, Merkmalsextraktion und Clusteranalyse genauer untersucht und Lösungsansätze für weitere Automatisierungsschritte aufgezeigt. Die einzelnen Verfahren sollen nun ausführlich diskutiert werden, wobei jeweils die Stärken aber auch Schwächen der untersuchten Methoden aufgezeigt werden.

Vorwegzunehmen ist allerdings, dass auch bei der Ableitung der Signale mit planaren Elektroden weiterhin Verbesserungen notwendig sind, um ein Optimum an Signalrauschabstand zu erzielen. Als besonders hervorzuheben ist hierbei der Abstand der Zellen und der Sensoren, der aufgrund der kapazitiven Ableitung mit den aktuell verfügbaren Sensorarchitekturen entsteht und dazu führt, dass Signalpegel ähnliche Amplituden wie Rauschanteile besitzen [5]. Des Weiteren wird die Signalqualität als auch -dynamik

- von der Art des Mediums (z.B. Leitfähigkeit, Kapazität) in dem sich die Zellen befinden;
- von der Art des Kontakts zwischen Zelle und Sensor, der im Wesentlichen durch die Kontaktfläche und dem Abstand zwischen Zelle und Elektrode beeinflusst wird;
- von der Oberflächenbeschaffenheit, dem Material, der Geometrie und der Impedanz der Elektroden;
- und letztendlich von den eingesetzten analogen und digitalen Signalverarbeitungskomponenten

beeinflusst, so dass sich für die Vielzahl an vorhandenen Sensor- und Zelltypen kein einzelnes und gleichzeitig optimales Verarbeitungsverfahren finden lassen wird. Generell ist jedoch anzunehmen, dass die vielfach eingesetzten Verfahren mit manueller bzw. fixer Parameterauswahl durch lern- und anpassungsfähige Algorithmen zu ersetzen sind, um den hohen Grad der Signaldynamik und die Ungewissheit der im Signal vorhandenen Informationen optimal zu berücksichtigen.

6.1 Signalfilterung

Aufgrund der relativ großen Abstände (≥ 50 nm) zwischen Zellen und Elektrode bei der kapazitiven Ableitung ist das Verhältnis der Signalamplituden von Aktionspotenzialen und Störanteilen bisher nur sehr gering und damit einer der Haupteinflussfaktoren bei der optimalen Auswertung und Analyse der Signale. Bisher haben sich für eine zerstörungsfreie Signalableitung noch keine anderen Sensortypen etabliert, so dass der erste Verarbeitungsschritt aus einer optimalen Trennung von Aktionspotenzialen und Störsignalanteilen besteht. Untersuchungen haben gezeigt, dass die Verwendung der Wavelet-Transformation als Filterstufe aufgrund ihrer effizienten spektralen Zerlegung und der einfachen Manipulation einzelner Frequenzbänder Vorteile gegenüber herkömmlichen Methoden wie bspw. FIR-Filtern bietet [169]. Im Gegensatz zu einfachen FIR-Filtern erfolgt bei der Wavelet-Transformation eine spektrale Zerlegung der im Signal vorhandenen Frequenzen. Die Grundlage dafür bilden geeignete Basis-Wavelets, die möglichst ähnliche Frequenzanteile wie die zu analysierenden Aktionspotenziale aufweisen. Ein optimales Basis-Wavelet zeichnet sich dadurch aus, dass nach der Wavelet-Transformation die resultierenden Wavelet-Koeffizienten besonders hohe Werte annehmen, wenn an dieser Stelle ein Aktionspotenzial im Signalgemisch vorhanden ist. Gleichzeitig sollten sich optimalerweise diese deutlich von anderen Signalanteilen, wie bspw. Störsignalen, unterscheiden.

In der Literatur werden bisher unterschiedliche Basis-Wavelets zur Signalfilterung eingesetzt, ohne dass deren Filterwirkungen und -einflüsse bei neuronalen Signalen bisher genauer untersucht worden sind. Eine genaue Untersuchungen gestaltet sich aber auch relativ schwierig, da kaum ein Signal dem anderen gleicht und die Vielzahl unterschiedlicher Parameter beliebig kombinierbar sind. Abhängig von der Lage, der Größe und des Abstands eines Neurons zu einer Elektrode verändern sich Signalamplitude und -form nicht nur bei verschiedenen Messungen, sondern auch während einer Messung infolge von Wachstums- und Verschiebungsprozessen. In Abschnitt 5.3 erfolgte deshalb ein Vergleich der Filterergebnisse von häufig verwendeten Basis-Wavelets anhand künstlich erzeugter Signale, um unkontrollierbare Einflüsse, wie sie in realen Signalen vorkommen, gering zu halten.

Die verwendeten Signale wurden mit Hilfe ausgewählter Basis-Wavelets in sechs Frequenzanteile zerlegt, verschiedenartige Verfahren zur Rauschminderung (*Denoising*, *Detrending* sowie eine Kombination aus beiden Verfahren) angewandt und das rücktransformierte Zeitsignal mit

dem rauschfreien Originalsignal verglichen. Für den Vergleich wurde die Kovarianz und die Berechnung des mittleren quadratischen Fehlers (RMSE) genutzt, da beide Verfahren bei dieser Art von Vergleichen häufig eingesetzt werden. Generell wurde festgestellt, dass beide Vergleichsverfahren bei unterschiedlichen *Denoising*- und *Detrending*-Ansätzen zum gleichen Ergebnis führen, so dass die Wahl der Vergleichsmethode für eine qualitative Aussage hierbei keine Rolle spielt.

Gleichzeitig erfolgten weitere Untersuchungen anhand unterschiedlicher Ansätze für das *Detrending* und das *Denoising*. Beim sog. *Detrending* werden durch Entfernen (Nullsetzen) der Wavelet-Koeffizienten im Detail- und Approximationsband cD_5 und cA_5 jeweils die niederfrequenten Signalanteile bis zu einer Grenzfrequenz $f_c \approx 300$ Hz entfernt, um das Signal einerseits vom Gleichanteil zu befreien, aber auch um niederfrequente Störanteile zu entfernen, die unter anderem durch lokale Feldpotenziale entstehen. Hochfrequente Störanteile sind in den abgeleiteten Signalen dominanter und aufgrund ihrer hohen Bandbreite deutlich schwerer zu minimieren. Die Wahl des Wavelets beim *Detrending* besitzt dabei jedoch keine größeren Auswirkungen. Anders verhält es sich bei hochfrequenten Signalanteilen. Um hochfrequente Signalanteile zu reduzieren, wird das *Denoising* eingesetzt. Dazu wird ein Schwellwert σ_{noise} aus den Koeffizienten eines oder mehrerer Frequenzbänder berechnet, in denen hauptsächlich Störanteile vermutet werden. Dieser Wert dient der Modifikation der Wavelet-Koeffizienten (*hard threshold*, *soft threshold*) zur Filterung.

Erfolgt eine Schätzung der Rauschanteile für σ_{noise} über cD_1 , erzielten bei den verwendeten Testsignalen mit einem Signal-Rauschabstand (SNR) von 1 dB bis 20 dB die Basis-Wavelets Symlet-5, Biorthogonal-1.3 und Biorthogonal-1.5 nach der Filterung die größte Korrelation mit dem rauschfreien Originalsignal. Generell entstehen aber im direkten Vergleich mit den anderen Basis-Wavelets keine signifikant großen Unterschiede. Deshalb ist es hier denkbar, Basis-Wavelets mit einer geringen Anzahl von Filter-Koeffizienten einzusetzen, um den Berechnungsaufwand klein zu halten. Eine signalabhängige Wahl von Basis-Wavelets wie sie bspw. in [340] vorgeschlagen wird, erscheint sehr aufwändig, da zusätzlich ein Maß gefunden werden muss, um das optimale Basis-Wavelets zu identifizieren. Aufgrund der geringen Unterschiede in der Korrelation mit dem Originalsignal wird jedoch vermutet, dass sich ein Mehraufwand zur Bestimmung eines optimalen Wavelets während der Laufzeit nicht lohnt.

Die Bestimmung der Schwellwerte σ_{noise} für die Modifikation der Wavelet-Koeffizienten kann auf mehreren Grundlagen erfolgen. Eine am häufigsten eingesetzte Variante ist die Abschätzung der durchschnittlichen Koeffizientenwerte aus dem Detailband cD_1 . Dieses Band besteht im Wesentlichen aus hochfrequenten Signalanteilen, die nur noch sehr wenige Frequenzen von Aktionspotenzialen beinhalten. Dadurch werden zwar Frequenzanteile von Aktionspotenzialen weniger verfälscht, allerdings bleiben dadurch Störanteile aus anderen Frequenzbändern unberücksichtigt.

Eine weitere Möglichkeit der Schätzung von σ_{noise} kann auf Basis jedes einzelnen Koeffizientenbandes (cD_1, \dots, cD_5) erfolgen. Der Vorteil dieser Variante ist, dass Störanteile aus allen Frequenzbändern berücksichtigt werden. Allerdings ist darauf zu achten, dass das Verfahren zur Bestimmung von σ_{noise} nach [170, 326] nicht zwischen Koeffizienten aus Stör- und Nutzfrequenzanteilen unterscheiden kann. Dadurch besteht eine hohe Wahrscheinlichkeit, dass Frequenzanteile von Aktionspotenzialen ebenfalls stark gedämpft werden.

Der Vergleich beider Varianten zur Bestimmung von σ_{noise} aus einem (cD_1) bzw. aus allen (cD_1, \dots, cD_5) Koeffizientenbändern und die Modifikation der Koeffizienten auf Basis der Schätzwerte für σ_{noise} zeigt, dass die Korrelation zwischen erster Variante und dem Originalsignal höher ist. Ähnlich der ersten Untersuchung, bei der σ_{noise} nur aus Koeffizienten aus cD_1 geschätzt wurde, erzielen das biorthogonale-1.3- und biorthogonale-1.5-Wavelet bei der Bestimmung von σ_{noise} aus cD_1 bis cD_5 die besten Filterergebnisse. Beide Fehlermessvarianten (Kovarianz und RMSE) zeigen aber, dass ein *Denoising* anhand der Koeffizienten cD_1 einen kleineren Fehler verursacht.

Theoretisch sollte eine optimale Rauschminderung des Signals erreicht werden, wenn individuelle Störanteile aus jedem einzelnen Frequenzband bei der Filterung berücksichtigt werden. Bei den untersuchten Signalen werden durch das in [326] vorgeschlagene Verfahren zur Filterung neuronaler Signale bessere Ergebnisse erzielt, wenn eine Schätzung für σ_{noise} anhand eines einzelnen Frequenzbandes erfolgt (hier cD_1), welches nur den hochfrequenten Signalanteil beinhaltet. Dieses Verfahren scheint deshalb für die Filterung neuronaler Signale nicht das Optimum darzustellen.

Zusätzlich zur Berechnung der Fehler zwischen gefiltertem Signal und Originalsignal wurde ein visueller Vergleich zwischen beiden Signalen durchgeführt (vgl. Abbildung 5.6 auf Seite 55). Hierbei zeigt sich, dass auch eine Filterung mittels Wavelets zu Signalverzerrungen und teilweise (beim Symlet-5-Wavelet) zu starken Dämpfungen führt. Berücksichtigt wurden bei der Untersuchung Signalrauschabstände (SNR) von 5 dB (blau), 10 dB (grün) und 15 dB (rot). Die Rauschsignale wurden mit Hilfe eines stochastischen Prozesses für jeden Signalrauschabstand separat erzeugt und anschließend additiv überlagert. Die gefilterten Signale weisen allerdings für alle drei Signalrauschabstände ähnliche Verzerrungen und Dämpfungen auf, so dass deren Ursache nicht im Rauschsignal, sondern in der Methode zur Bestimmung von σ_{noise} , T_{noise} bzw. der Modifikation der Koeffizienten zu suchen ist.

Dass Wavelets bei der Entstörung neuronaler Signale anderen Filtermethoden vorzuziehen sind, wurde in [169] gezeigt. Die Untersuchungen in dieser Arbeit lassen vermuten, dass zumindest das *VisuShrink*-Verfahren nach [170] für die Entstörung neuronaler Signale noch kein Optimum darstellen. Generell ist aber die Verwendung der Wavelet-Transformation für eine mathematisch effiziente spektrale Zerlegung und die Möglichkeit der gezielten Modifikation von Koeffizienten der richtige Weg. Weitere Untersuchungen sollten am Schätzverfahren zur Bestimmung der im

Signal befindlichen Rauschanteile sowie den Verfahren zur Modifikation von rauschbehafteten Wavelet-Koeffizienten durchgeführt werden.

Verarbeitung finiter Signale

Ein weiterer Untersuchungspunkt war die Verwendung endlicher Signalausschnitte in Verbindung mit der Modifikation von Wavelet-Koeffizienten zur Filterung. Sollen kontinuierliche Signale in Echtzeit analysiert werden, müssen sie zum Zwecke der Verarbeitung in finite Signalausschnitte unterteilt werden. Die Sequenzlängen sollten sich dabei an der Mindestanzahl an Abtastwerten für die jeweilige Wavelet-Transformation richten (vgl. auch Tabelle 5.1). An den Rändern der Signalausschnitte kommt es jedoch zu Artefakten, die infolge der Modifikation der Koeffizienten durch das *Detrending* und *Denoising* auftreten. Diese Artefakte haben eine besonders starke Ausprägung, wenn Signlränder durch einen starken Anstieg gekennzeichnet sind. Das *Detrending*, also die Modifikation der tiefen Frequenzanteile (cD_5 und cA_5), hat dabei einen stärkeren Einfluss auf die Artefaktbildung als das *Denoising*. Die aus der Modifikation der Koeffizienten resultierenden Artefakte sind durch einen starken Anstieg oder Abfall der Amplitude gekennzeichnet, wobei Größenordnungen ähnlich der von Aktionspotenzialen erreicht werden. Die Artefakte werden durch die Spikeerkennung ebenfalls extrahiert und führen bei nachfolgenden Verarbeitungsschritten zu einer höheren Fehlerrate.

Die Ursache für die Artefakte an den Signlrändern wird in der künstlichen Signalerweiterung vermutet. Um diese zu reduzieren, wurden in [341] unterschiedliche Verfahren zur künstlichen Signalergänzung vorgeschlagen. Bei neuronalen Signalen erzielen die Erweiterungsverfahren nur minimale Verbesserungen, was im Wesentlichen auf die instationären Signaleigenschaften zurückgeführt werden kann. Als Alternative dazu wurde ein Verfahren vorgeschlagen, welches auf der Verwendung der tatsächlichen Werte basiert. Dabei muss zwar eine höhere Zeitverzögerung und eine redundante Verarbeitung in Kauf genommen werden, die Artefakte an den Übergangsstellen wurden aber deutlich reduziert. Untersuchungen mit simulierten als auch realen neuronalen Signalen erzielten im Vergleich zu den Signalerweiterungsmethoden aus [341] deutlich geringere Störungen.

Beim *Detrending* wurden bisher die Koeffizienten aus cD_5 und cA_5 vollständig gelöscht bzw. auf Null gesetzt. Hierfür sollten weitere Methoden untersucht werden, bei der die Koeffizienten ähnlich dem *Denoising* modifiziert werden und damit zu einer geringeren Artefaktbildung führen.

Erweitertes waveletbasiertes Entstören

Bei der Analyse des Filterverfahrens nach Donoho [170] wurde festgestellt, dass die Bestimmung von σ_{noise} anhand eines Frequenzbandes und die anschließende Modifikation der Koeffizienten nur dann zu einer optimalen Entstörung führt, wenn die Rauschleistung über dem gesamten Frequenzbereich konstant ist oder nur im oberen Frequenzbereich auftritt. Dies trifft vor allem auf künstlich erzeugte Signale zu. Bei realen Signalen können Störanteile ungünstiger verteilt sein.

Um individuelle Störanteile aus jedem einzelnen Frequenzband optimal zu entfernen, wurde in Abschnitt 5.5 ein neues Verfahren vorgeschlagen.

Das Verfahren nach [170] wird aufgrund der ursprünglichen Entwicklung zur Entstörung von Bildsignalen als *VisuShrink* bezeichnet und auch häufig bei der Entstörung neuronaler Signale eingesetzt [199, 223]. Im Vergleich zu Bildsignalen treten Aktionspotenziale nur in diskreten Zeitabschnitten auf. Störsignale dagegen sind quasistationär im gesamten Signalverlauf vorhanden. Unter der Annahme, dass eine zuverlässige Erkennung von Aktionspotenzialen auch ohne vorherige Entstörung möglich ist, kann eine genauere Abschätzung der Störfrequenzen über einen größeren Frequenzbereich mit dem in Abschnitt 5.5 vorgestellten Verfahren erfolgen. Zur Schätzung der Rauschanteile werden dabei die Signalausschnitte zwischen zwei Aktionspotenzialen verwendet.

Für die zuverlässige Erkennung von Aktionspotenzialen aus einem ungefilterten Signal wurden drei unterschiedliche Verfahren untersucht. Der *Teager Energy Operator* (TEO) [214] konnte durch Tests als bestes Verfahren ermittelt werden. TEO benötigt im Vergleich zu den zwei anderen Verfahren die wenigstens mathematischen Operationen und kann darüber hinaus zuverlässig Aktionspotenziale auch bei sehr niedrigen Signalrauschabständen detektieren. Für die Verwendung bei den untersuchten Signalen wurde das ursprüngliche Verfahren leicht modifiziert, da es bei neuronalen Signalen in dieser Form zu einer besseren Erkennung von Aktionspotenzialen führt. Weitere Informationen dazu sind in Anhang B zu finden.

Mit Hilfe des TEO werden vor der Entstörung kurze Signalausschnitte (1024 Abtastwerte, ca. 5 ms) auf das Vorhandensein von Aktionspotenzialen untersucht. Wird in einem Signalausschnitt kein Aktionspotenzial erkannt, werden die Wavelet-Koeffizienten des jeweiligen Frequenzbandes zur Schätzung der Rauschinformationen genutzt. Um stark instationäre Schwankungen auszugleichen, erfolgt die Anpassung des Schätzwertes auf Basis vorangegangener Werte mit Hilfe eines Lernfaktors η . Durch Modifikation von η kann eine schnellere oder langsamere Anpassung instationärer Schwankungen erfolgen. Für die eigenen Untersuchungen wurde für η der Wert 0,02 empirisch ermittelt.

In Tests mit realen und künstlich erzeugten Signalen konnte nachgewiesen werden, dass das *Enhanced Wavelet Denoising* im Vergleich zu *VisuShrink* vor allem bei realen Signalen eine bessere Entstörung erzielt (vgl. Abbildung 5.13, S. 61). Im Unterschied zu realen Signalen werden bei künstlich erzeugten Signalen Störungen vor allem in Form von hochfrequenten Signalanteilen überlagert [315], die sich auch mittels *VisuShrink* wieder optimal entfernen lassen. Befindet sich die Hauptenergie der Störanteile jedoch nicht im oberen Frequenzband, kann mit *VisuShrink* ebenfalls nicht der optimale Wert für σ_{noise} geschätzt werden. Das *Enhanced Wavelet Denoising*-Verfahren dagegen ermittelt ein optimales σ_{noise} aus jedem einzelnen Frequenzband und bestimmt T_{noise} vollständig adaptiv für jedes individuelle Frequenzband. Abhängig von den Rauschanteilen in

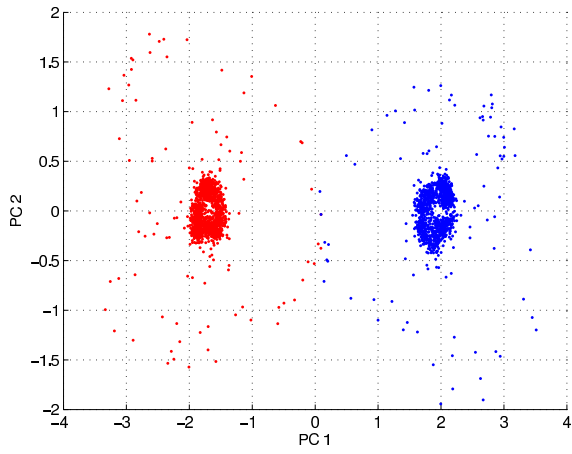
den einzelnen Frequenzbändern wird T_{noise} entsprechend angepasst und die rauschbehafteten Wavelet-Koeffizienten werden modifiziert.

In Abbildung 6.1 wurden Signale mit unterschiedlichen Signalrauschabständen (SNR=3,2; 2,3 und 1,6) einmal mit *VisuShrink* und mit *Enhanced Wavelet Denoising* gefiltert und anschließend die Merkmale mittels Hauptkomponentenanalyse bestimmt und dargestellt. Zu erkennen sind jeweils 2 *Units*, die entsprechend ihres Ursprungs farblich dargestellt sind. Bei beiden Verfahren wird eine hohe Interclustervarianz (Entfernung von zwei unterschiedlichen Clustern) erzielt. Die Intraclustervarianz (Streuung von Werten innerhalb eines Clusters) konnte mittels EWD verkleinert werden. Die Gründe dafür sind in der adaptiven Anpassung von T_{noise} zu suchen. Kurzzeitige Signalschwankungen werden beim EWD besser berücksichtigt und führen zu einer geringeren Intraclustervarianz.

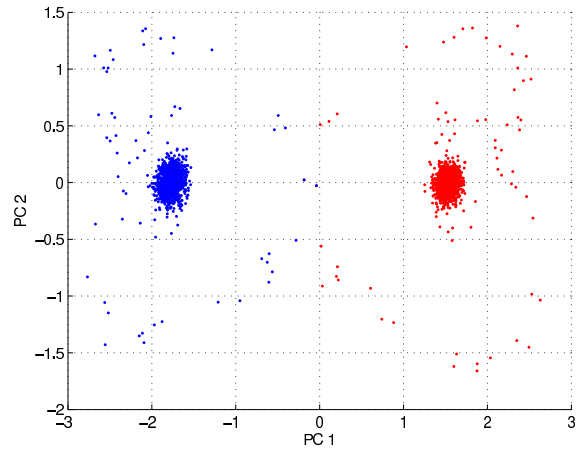
Ein kritischer Punkt bei der Verwendung von *Enhanced Wavelet Denoising* ist die Wahl der Fensterlänge, in denen vor der Filterung mögliche Aktionspotenziale erkannt werden müssen. Für die Untersuchungen wurde der TEO über 1024 Abtastwerte berechnet. Sobald im Signal andere Komponenten als Störsignale vorhanden sind, wächst dieser Wert stark an und ist ein Zeichen für das Vorhandensein von Aktionspotenzialen. Wird ein zu großes Zeitfenster für die Berechnung von TEO gewählt, ist davon auszugehen, dass im Signalabschnitt sehr häufig Aktionspotenziale enthalten sind und damit ein Optimum für T_{noise} nur langsam gefunden werden kann. Die Berechnung von TEO über 1024 Abtastwerte wurde gewählt, da diese Anzahl an Abtastwerten das Minimum für eine anschließende Wavelet-Transformation sind. Sind im auszuwertenden Signal nur wenige Aktivitäten zu erwarten, können auch längere Signalausschnitte verwendet werden. Bei Signalen mit sehr hohen ISI-Werten (*inter-spike interval*) und entsprechend kurzen Ruhephasen zwischen zwei Aktionspotenzialen kann eine Optimierung von T_{noise} sehr lange dauern bzw. sogar vollständig verhindert werden. Für diese Fälle wäre es denkbar, beide Verfahren – *VisuShrink* und *Enhanced Wavelet Denoising* – zu kombinieren, so dass das Entstörverfahren bei sehr geringen ISI-Werten *VisuShrink* nutzt und bei Vorhandensein ausreichend großer Abstände zwischen zwei Aktionspotenzialen EWD verwendet. Weitere Untersuchungen dazu sind aber nicht Gegenstand dieser Arbeit.

Weiterhin ist die zuverlässige Erkennung von Aktionspotenzialen im Signalausschnitt vor der Entstörung ein wichtiger Faktor. Werden Aktionspotenziale mit sehr kleiner Amplitude im Signal nicht erkannt, werden unter Umständen falsche Frequenzanteile vom Filterverfahren adaptiert und als Störsignal interpretiert. Dies kann zur Minimierung bis hin zur vollständigen Unterdrückung von Aktionspotenzialen führen. Tritt dieser Fall bei vereinzelt Aktionspotenzialen mit sehr kleinen Amplituden auf, wird eine vollständige Filterung durch die adaptive Anpassung von T_{noise} verhindert.

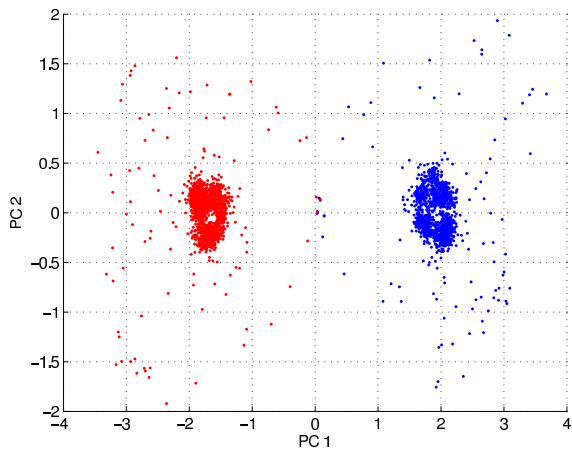
Bei den bisher verwendeten Filterkonzepten werden Sensoren lediglich als isoliert betrachtet. Multi-elektroden-Arrays bestehen jedoch aus einer Vielzahl an Sensoren, die neben der Ableitung von



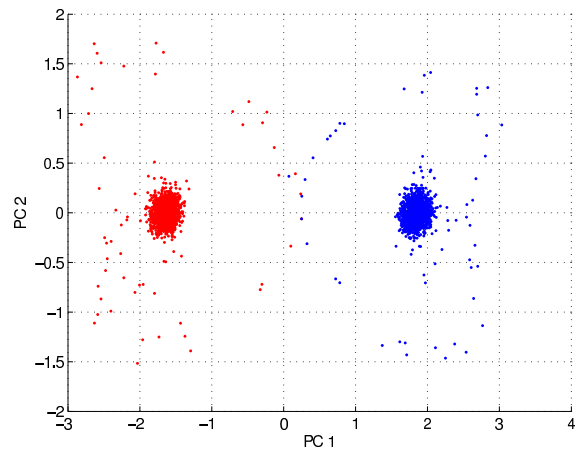
(a) VisuShrink, SNR=3.2



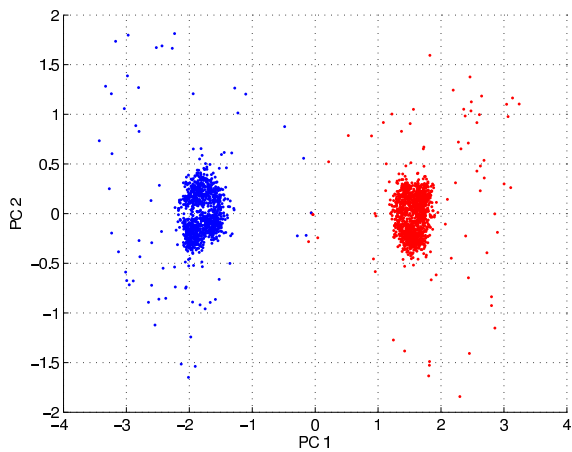
(b) EWD, SNR=3.2



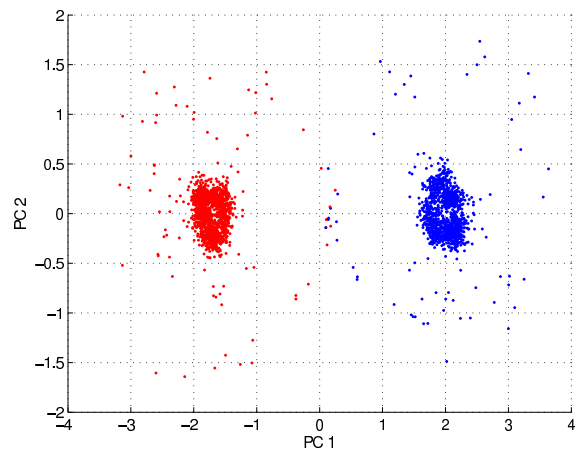
(c) VisuShrink, SNR=2.3



(d) EWD, SNR=2.3



(e) VisuShrink, SNR=1.6



(f) EWD, SNR=1.6

Abbildung 6.1 Visueller Vergleich der Separation von zwei Clustern, die bei unterschiedlichen Signalrauschabständen (SNR) mit *VisuShrink* und dem *Enhanced Wavelet Denoising* (EWD) entstört wurden.

Aktionspotenzialen aus Neuronenpopulationen ebenfalls für neue Entstörkonzepte verwendet werden können. Beim *Enhanced Wavelet Denoising* ist es notwendig, Signalabschnitte vor der Filterung auf Aktionspotenziale zu untersuchen, da sie sonst nicht für die Analyse der Rauscheigenschaften verwendet werden können. Dass dafür robuste Verfahren notwendig sind, wurde bereits erläutert. Bei MEAs mit einer hohen Sensordichte kann eine Analyse der Rauschinformationen aber auch anhand umliegender und ungenutzter Sensoren erfolgen. Globale Rauschanteile, die bisher anhand einer oder mehrerer Frequenzbänder abgeschätzt wurden, könnten aus umliegenden Sensoren ermittelt werden. Dabei liefern diese Sensoren ein Referenzsignal, welches zu einer besseren Rauschminimierung in adaptiven Filtern eingesetzt werden kann. Global auftretende Störimpulse mit einer hohen Signalenergie werden zudem von mehreren Sensoren gleichzeitig erfasst und können zur sicheren Erkennung von *false positives* eingesetzt werden.

Diese Überlegungen konnten bisher jedoch nur rein theoretisch durchgeführt werden und wurden in dieser Arbeit nicht ausführlicher untersucht. Der Grund dafür liegt vor allem an den dazu notwendigen Verfahren zur Erstellung künstlicher Signale. Um diese Verfahren zu testen, werden entsprechende Signale benötigt, die in dieser Form noch nicht künstlich erzeugt werden können. Erste Ansätze dazu sind in [317] zu finden und werden in Zukunft neuartige Filterkonzepte ermöglichen.

6.2 Extraktion von Merkmalen in Echtzeit

Ein Verarbeitungsschritt, der bisher nur Offline zuverlässig durchgeführt werden konnte, ist die Extraktion von Merkmalen. Dieser erfolgt mit Hilfe der Hauptkomponentenanalyse (PCA) mit dem sich wesentliche Eigenschaften von Signalen bestimmen lassen, sofern alle Daten vollständig vorhanden sind. Wählt man einen langen Signalausschnitt, bei dem alle abgeleiteten Aktionspotenziale vorliegen, kann man die entsprechenden Merkmale (Hauptkomponenten) bestimmen, die anschließend zur Separation von Aktionspotenzialen eingesetzt werden. Dadurch ist aber keine Extraktion von Merkmalen zur Laufzeit möglich. Außerdem besteht die Gefahr, dass sich Merkmale von Aktionspotenzialen im Laufe einer Messung ändern, sich Cluster verschieben oder mit anderen Clustern überlagern. Eine mathematische Bestimmung der Anzahl der Cluster sowie deren Grenzen wird dadurch deutlich erschwert.

Als Alternative zur klassischen Hauptkomponentenanalyse wurde deshalb ein Verfahren untersucht, bei dem mit Hilfe eines neuronalen Netzes ebenfalls Eigenschaften von Signalen extrahiert werden können. Die extrahierten Eigenschaften ähneln den Hauptkomponenten der PCA und können deshalb ebenso für ein *Clustering* verwendet werden. Der Vorteil des neuronalen Verfahrens besteht darin, dass Merkmale kontinuierlich extrahiert werden können. Ein Hauptmerkmal von neuronalen Netzen ist die Fähigkeit der Anpassung und Adaption. Diese Fähigkeit wird bei der Merkmalsextraktion ausgenutzt, um die Qualität der extrahierten Merkmale kontinuierlich zu verbessern. Merkmale, die sehr häufig auftreten, werden deshalb auch bei der Extraktion stärker

berücksichtigt als jene, die seltener auftreten. Das neuronale Verfahren verbessert daher mit jedem neuen Datensatz die Auswahl der Merkmale.

Ein weiterer wesentlicher Vorteil der neuronalen Merkmalsextraktion ist die kontinuierliche Anpassung. Kommt es infolge von Driftprozessen zu einer Veränderung der Form der abgeleiteten Aktionspotenziale, entstehen bei der klassischen Hauptkomponentenanalyse neue Cluster oder sie ändern ihre Lage im Koordinatensystem. Beides hat negative Auswirkungen auf die automatische Clusteranalyse.

Treten bestimmte Aktionspotenzialformen nur sehr selten auf, werden sie durch das neuronale Netz nicht berücksichtigt. Seltene Kurvenverläufe entstehen häufig durch die Überlappung zweier Aktionspotenziale oder infolge von Störungen. Während die klassische Hauptkomponentenanalyse hierbei neue Cluster ermittelt, benötigt das neuronale Netz eine signifikante Anzahl an Signalformen, um ein neues Cluster zu erzeugen. Störungen wirken sich damit deutlich geringer auf die Merkmalsextraktion aus. Auch Fehlausrichtungen von Aktionspotenzialen (*spike alignment*) wirken sich bei der neuronalen Merkmalsextraktion im Vergleich zu klassischen PCA deutlich geringer aus.

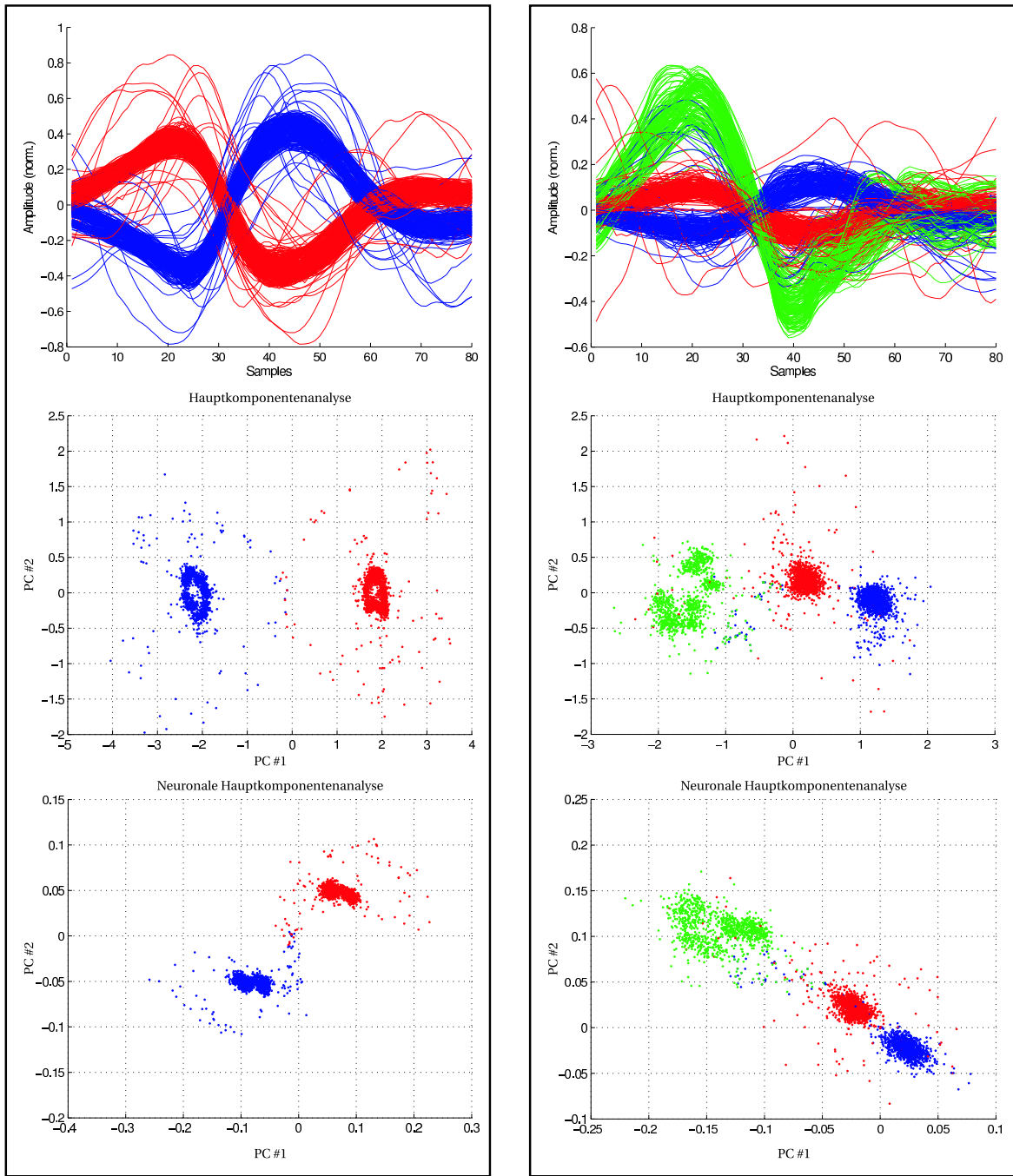
Für die Extraktion von Merkmalen wurden die klassische sowie adaptive Hauptkomponentenanalyse verglichen. Vorteile der adaptiven Merkmalsextraktion liegen in der Echtzeit- bzw. *Online*-Berechnung der Hauptkomponenten, dem deutlich geringeren Berechnungsaufwand und den geringeren Speicherressourcen (vgl. Tabelle 6.1). Es wurde untersucht, ob das adaptive Verfahren ähnliche Ergebnisse liefert wie das klassische Verfahren zur Merkmalsextraktion und in welchem Rahmen das klassische durch das neuronale Verfahren ersetzt werden kann.

Tabelle 6.1 Vergleich zwischen neuronaler und klassischer Hauptkomponentenanalyse.

Parameter	Neuronale PCA	Klassische PCA
Berechnungsaufwand	gering	hoch
Speicherbedarf	gering	hoch
Berechnungsart	online	offline

Die Ergebnisse der Untersuchungen sind in Abbildung 6.2 exemplarisch für zwei Signalvarianten dargestellt. Beim Vergleich beider Verfahren wurden künstliche Signale mit Hilfe von *Noisy Spike Generator* [316] erzeugt, die bis zu 3 *Units* enthielten und Signalrauschabstände von 4,6, 3,2, 2,3 und 1,6 aufweisen. Bei den untersuchten Signalen wurden die Cluster jeweils mit beiden Verfahren richtig ermittelt.

Bei Tests zur Bestimmung der Hauptkomponenten durch die neuronale PCA und die klassische PCA hat sich gezeigt, dass die neuronale PCA in der Lage ist, entsprechende Gemeinsamkeiten zu finden und diese zu Gruppieren. Beide Verfahren sind durch eine hohe Interclustervarianz und eine geringe Intraclustervarianz gekennzeichnet.



(a) 2 Units

(b) 3 Units

Abbildung 6.2 Visueller Vergleich der Merkmalsextraktion von zwei bzw. drei *Units* mit Hilfe der klassischen und neuronalen Hauptkomponentenanalyse bei einem SNR von 4,6.

Abhängig für den Erfolg der neuronalen Merkmalsextraktion sind dabei die Variablen η (Lernrate) und die Startwerte der Wichtungen ω . Mit η kann die Konvergenzgeschwindigkeit des Netzwerks beeinflusst werden. Kleine Werte für η führen zu einer langsamen Konvergenz, so dass eine größere Auswahl an Stichproben zur Anpassung von ω berücksichtigt werden. Tritt eine *Unit* nur sehr selten auf, kann es durch Wahl eines zu großen η dazu führen, dass die Hauptkomponenten gegenüber anderen, häufiger auftretenden Merkmalen vernachlässigt werden. Generell ist es sinnvoll, das neuronale Netz nicht vollständig konvergieren zu lassen. Die Lernrate η kann zwar mit neuen Stichproben verkleinert werden, sollte jedoch nach einigen Stichproben konstant bleiben, um sich kontinuierlich an Signaländerungen anzupassen. Für die eigenen Untersuchungen wurde für η der Wert 0,001 verwendet. Wird der Wert für η zu groß gewählt, kann es vorkommen, dass das Optimum für das extrahierte Merkmal nicht erreicht wird.

Neben den Vorteilen wie Lernfähigkeit, höherer Fehlertoleranz, Robustheit gegenüber Störungen und verrauschten Daten, die künstliche neuronale Netze mit sich bringen [342], ergeben sich gleichermaßen Gefahren aus der Intransparenz des Lernvorgangs und den Startwerten für die Wichtungen ω des neuronalen Netzes. Die Startwerte für ω werden mit Zufallszahlen zwischen $-0,05$ und $0,05$ initiiert und konvergieren entsprechend den Stichproben.

Ein anderer Nachteil ergibt sich aus der Robustheit von neuronalen Netzen. Die Robustheit, die in vielen Fällen eher eine positive Eigenschaft darstellt, kann bei bestimmten Signalen auch einen negativen Einfluss haben. Treten einige Aktionspotenziale nur in sehr seltenen Fällen auf, werden diese vom neuronalen Netz als Störung interpretiert und bei der Auswertung kaum berücksichtigt. In der Praxis haben jedoch Aktionspotenziale, die statistisch gesehen nur sehr selten auftreten keinen besonderen Einfluss auf die Gesamtauswertung des Signals.

6.3 Clusteranalyse

Für die Clusteranalyse wurden künstliche Signale mit unterschiedlichen Signalrauschabständen (SNR=1,6 bis 4,6) und jeweils zwei bzw. drei *Units* erzeugt. Die verwendeten Signalformen sind in Abbildung 6.3 zu sehen. Die erzeugten Signale besitzen eine Länge von 120 Sekunden und wurden mit einer Abtastfrequenz von 20 kHz digitalisiert. Die Signale wurden mit *Enhanced Wavelet Denoising* gefiltert und die Aktionspotenziale im Anschluss extrahiert. Die Merkmale aus den extrahierten Aktionspotenzialen wurden einmal mit der neuronalen (online) und der klassischen (offline) PCA bestimmt. Die ersten beiden Merkmale wurden anschließend mit x -means geclustert und danach mit Hilfe der euklidischen Abstandsmetrik einem Cluster bzw. einer *Unit* zugeordnet. Aufgrund der künstlich erzeugten Signale konnten die richtigen und falsch zugeordneten Aktionspotenziale einer *Unit* ermittelt werden. Die Ergebnisse des Vergleichs sind in Tabelle 6.2 zu finden.

Sind in einem Signal nur zwei *Units* vorhanden (vgl. Abbildung 6.3, roter und blauer Signalverlauf),

werden sowohl mit der klassischen als auch der neuronalen Hauptkomponentenanalyse ähnliche Ergebnisse beim Clustern erzielt. Das Verhältnis zwischen richtig und falsch zugeordneten Daten unterscheidet sich kaum bei der klassischen und neuronalen Hauptkomponentenanalyse und zeigt ebenfalls keine signifikanten Unterschiede bei verschiedenen Signalrauschabständen. Die Fehlerrate der zugeordneten Daten liegt für alle untersuchten Signalrauschabstände bei zwei *Units* deutlich unter 1 %.

Bei der Untersuchung von Signalen mit drei *Units* (vgl. Abbildung 6.3, roter, blauer und grüner Signalverlauf) fallen die Fehlerraten deutlich größer aus. Bei einem Signalrauschabstand von 1,6 wurde bei der klassischen Hauptkomponentenanalyse sogar eine Fehlerrate von 12 % verursacht. Bei den anderen Signalrauschabständen (2,3; 3,2 und 4,6) liegen die Fehlerraten sowohl bei der klassischen und neuronalen Hauptkomponentenanalyse im Durchschnitt unter 4 %. Im Gesamtdurchschnitt liegt die Fehlerrate bei der klassischen Hauptkomponentenanalyse bei 3,5 % und bei der neuronalen Hauptkomponentenanalyse bei 4,3 %.

Die neuronale Hauptkomponentenanalyse erzielt im Vergleich zur klassischen Hauptkomponentenanalyse vergleichbare Ergebnisse und ermöglicht zusammen mit *x*-means eine automatische Merkmalsextraktion und Clusteranalyse. Darüber hinaus können mit diesen Verfahren Aktionspotenziale in Echtzeit ausgewertet werden, da eine Merkmalsextraktion *online* durchgeführt werden kann und diese Merkmale automatisch mit *x*-means geclustert werden können.

6.4 Zusammenfassung

Für eine optimale Auswertung neuronaler Signale, die mittels planaren Elektroden aus Zellen abgeleitet werden, ist eine vollständig automatische Signalauswertung in Echtzeit notwendig. Während dies bei der Filterung und der Erkennung von Spikes bereits realisiert werden konnte, benötigen die

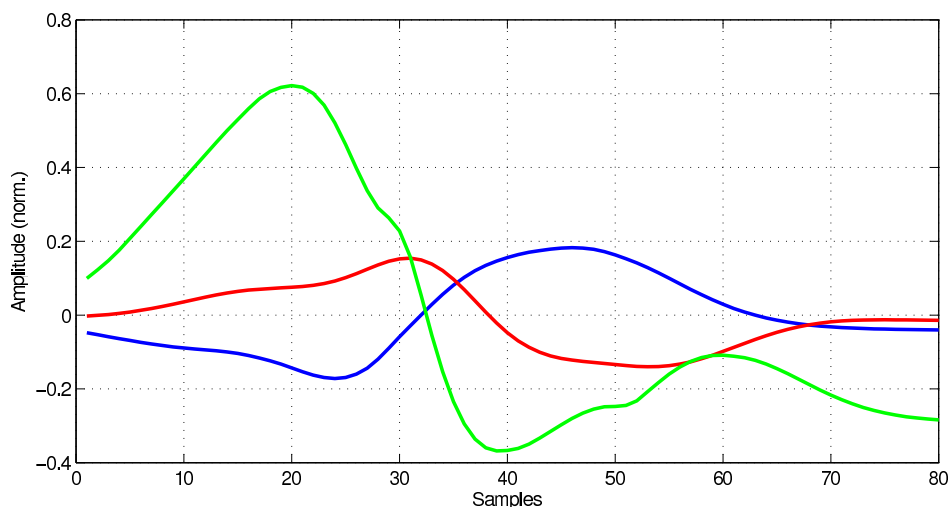


Abbildung 6.3 Verwendete Signalformen für Aktionspotenziale bei künstlich erzeugten Signalen.

Tabelle 6.2 Richtig und fehlerhafte Zuordnung von *Units* beim automatischen *Spike sorting* künstlich erzeugter Daten mit unterschiedlichen Signalauswahrscheinlichkeiten (SNR). Die Merkmalsextraktion (ME) erfolgte mit der neuronalen (nPCCA) und der klassischen (KPCCA) Hauptkomponentenanalyse. Die Fehlerrate (FR) falsch zugeordneter Aktionspotenziale ist jeweils in Prozent angegeben.

SNR	ME	Units	Unit #1		FR (%)	Unit #2		FR (%)	Unit #3		FR (%)	FR \varnothing (%)
			richtig	falsch		richtig	falsch		richtig	falsch		
1,6	KPCCA	2	1181	5	0,4	1325	6	0,4	—	—	—	0,4
	nPCCA	2	1182	6	0,5	1326	5	0,4	—	—	—	0,5
	KPCCA	3	1031	125	12,1	1294	37	2,9	952	21	2,2	5,7
	nPCCA	3	1093	70	6,4	1275	56	4,4	940	31	3,3	4,7
2,3	KPCCA	2	1158	3	0,3	1329	3	0,2	—	—	—	0,3
	nPCCA	2	1171	3	0,3	1323	8	0,6	—	—	—	0,5
	KPCCA	3	1132	52	4,6	1309	31	2,4	964	15	1,6	2,8
	nPCCA	3	1138	45	4,0	1285	47	3,7	972	26	2,7	3,4
3,2	KPCCA	2	1194	3	0,3	1312	8	0,6	—	—	—	0,5
	nPCCA	2	1194	2	0,2	1316	8	0,6	—	—	—	0,4
	KPCCA	3	1155	46	4,0	1308	31	2,4	974	9	0,9	2,4
	nPCCA	3	1110	68	6,1	1261	59	4,7	949	40	4,2	5,0
4,6	KPCCA	2	1174	1	0,1	1321	5	0,4	—	—	—	0,3
	nPCCA	2	1139	6	0,5	1318	7	0,5	—	—	—	0,5
	KPCCA	3	1106	54	4,9	1292	34	2,6	956	16	1,7	3,0
	nPCCA	3	1138	49	4,3	1266	60	4,7	940	35	3,7	4,2

Merkmalsextraktion und die Clusteranalyse entweder manuelle Eingriffe oder arbeiten bisher nur *offline*. Mit Hilfe der neuronalen Hauptkomponentenanalyse können Merkmale nicht nur *online* und damit deutlich schneller ermittelt werden, sondern es werden für die Bestimmung der Merkmale auch wesentlich weniger Speicherressourcen und Berechnungsaufwand benötigt. Zudem passen sich neuronale Netze an sich ändernde Signaleigenschaften an und führen damit auch zu einer optimalen Extraktion von Merkmalen über einen langen Analysezeitraum.

Durch die Verwendung von x -means kann anschließend aus den extrahierten Merkmalen automatisch die Anzahl der Cluster ermittelt werden. Mit Hilfe einer einfachen Abstandsmetrik werden neu extrahierte Merkmale einem Cluster und damit einer *Unit* zugeordnet.

Ergänzt wurden beide Verfahren durch ein neues Filterverfahren, bei dem eine bessere Abschätzung der Rauschanteile erfolgt. Die Grundlage dafür bildet die spektrale Zerlegung des Signals mit Hilfe der Wavelet-Transformation. Innerhalb der Zeiträume, in denen nur Rauschanteile im Signal vorhanden sind, werden die einzelnen Filter so adaptiert, dass sie diese optimale entfernen.

7 Zusammenfassung und Ausblick

Die neuronale Verarbeitung extern stimulierter Ereignisse basiert auf der Kommunikation einer großen Anzahl miteinander verbundener Neuronen. Um die elektrischen Vorgänge in Neuronenpopulationen in ihrer Gesamtheit analysieren zu können, sind Untersuchungsmethoden notwendig, die Signale von einer Vielzahl von Neuronen gleichzeitig ableiten können. Aktuelle Multielektroden-Arrays ermöglichen bereits eine zerstörungsfreie Signalableitung, erfordern aber einen hohen Aufwand bei der Extraktion der Aktivitäten einzelner Neuronen aus den abgeleiteten Signalen. Dieser aus mehreren Arbeitsschritten bestehende Vorgang wird als *Spike sorting* bezeichnet. Nur ein vollständig automatisiertes und in Echtzeit durchführbares *Spike sorting* ermöglicht eine effiziente Verwendung der Multielektroden-Array-Systeme im akademischen und kommerziellen Umfeld.

Das Ziel dieser Arbeit war daher die Untersuchung von zwei Teilarbeitsschritten des *Spike sortings* unter dem Gesichtspunkt der vollständigen Automatisierung und der Echtzeit-Verarbeitung der Signale.

Der erste untersuchte Teilarbeitsschritt war die Extraktion von Merkmalen aus bereits detektierten Aktionspotenzialen. Ein sehr häufig verwendetes Verfahren dafür ist die Hauptkomponentenanalyse. Die klassische Hauptkomponentenanalyse kann Eigenschaften von Signalen nur *offline* verarbeiten, weshalb eine vollständige Zwischenspeicherung der Daten notwendig ist. Erst wenn alle Informationen vorhanden sind, können die entsprechenden Signale weiterverarbeitet werden. Die in dieser Arbeit vorgestellte neuronale Hauptkomponentenanalyse ermöglicht die sofortige Extraktion von Merkmalen, sobald ein neu detektiertes Aktionspotenzial zur Verfügung steht. Das Verfahren basiert auf einem künstlichen neuronalen Netz, welches automatisch markante Merkmale von Signalformen extrahiert. Merkmale, die mit Hilfe des neuronalen Netzes extrahiert werden, sind denen der klassischen Hauptkomponentenanalyse ähnlich und können deshalb ebenfalls zu Clusterung verwendet werden. Darüber hinaus ist die neuronale Hauptkomponentenanalyse robuster gegenüber Rauschanteilen im Signal und kann sich an ändernde Signaleigenschaften anpassen, die durch Wachstums- und Driftprozesse verursacht werden. Da die neuronale Hauptkomponentenanalyse neue Informationen sofort verarbeiten kann, müssen diese nicht über einen längeren Zeitraum zwischengespeichert werden. Somit benötigt die neuronale Hauptkomponentenanalyse deutlich weniger Speicherbedarf und ermöglicht eine effizientere Verarbeitung der Signale.

Der zweite untersuchte Teilarbeitsschritt war die Clusteranalyse. Die extrahierten Merkmale einer *Unit* führen im zwei- oder dreidimensionalen Raum zur Bildung von Punktwolken. Ziel der

Clusteranalyse ist das Auffinden der Clustermittelpunkte und der dazugehörigen Wertepaare. Das häufig verwendete k -means-Verfahren kann diese Clustermittelpunkte zwar bestimmen, benötigt dafür aber die richtige Anzahl der Cluster. Dieser Arbeitsschritt konnte deshalb nur manuell durchgeführt werden. Die Erweiterung von k -means zu x -means ermöglicht durch zusätzliche Kriterien die automatische Bestimmung der Anzahl der Cluster. Mit Hilfe eines Abstandskriteriums werden die extrahierten Merkmale automatisch einem Clustermittelpunkt und damit einer *Unit* zugeordnet.

Weitere Untersuchungen erfolgten bei der Filterung der Eingangssignale. Obwohl dieser Verarbeitungsschritt bereits automatisiert und in Echtzeit durchgeführt werden kann, stellt er die Grundlagen für alle weiteren Verarbeitungsschritte dar. Besitzen abgeleitete Signale hohe Rauschanteile, ist die Fehlerrate der sich anschließenden Verarbeitungsprozesse deutlich höher. Das bisher verwendete Filterverfahren schätzt die Rauscheigenschaften des Eingangssignals anhand eines einzelnen Frequenzbandes ab und filtert auf Basis dieser Schätzung alle anderen Frequenzbänder. Sind die im Signal vorhandenen Rauschanteile nicht gleichverteilt, können Eingangssignale nicht optimal entstört werden. Das in dieser Arbeit vorgeschlagene Filterverfahren erweitert das herkömmliche Prinzip um die Möglichkeit einer genaueren Schätzung der im Signal vorhandenen Störanteile. Dazu werden Störsignalanteile aus allen Frequenzbereichen jeweils zwischen zwei Aktionspotenzialen untersucht und die zur Modifikation notwendigen Schwellwerte anhand dieser Informationen adaptiert. Eingangssignale werden daher nicht nur auf Basis eines Schwellwertes, sondern mehrerer optimierter Schwellwerte entstört. Dadurch können individuelle Störanteile berücksichtigt besser werden.

Die untersuchten Verfahren zur Extraktion von Merkmalen sowie zum Auffinden der Cluster ergänzen die bereits vorhandenen Signalverarbeitungsschritte des *Spike sortings* und ermöglichen nun eine vollständige rechnerbasierte Signalauswertung. Mit Hilfe von künstlich erzeugten Signalen konnte die *Online*-Extraktion von Merkmalen sowie die automatische Clusteranalyse erfolgreich demonstriert werden.

Auf Grundlage der vorgestellten Verfahren sind jedoch weitere Untersuchungen notwendig. Bisher wurden nur künstliche Signale, die mit Hilfe des *Noisy Spike Generator* erzeugt wurden, verwendet. Künstlich erzeugte Signale beinhalten jedoch nicht alle Komponenten, wie sie in realen Signalen vorkommen, bieten aber eine einfache Möglichkeit, Ergebnisse zu verifizieren. Um reale Signale mit den vorgestellten Methoden untersuchen und verifizieren zu können, sollten reale Signale einmal manuell sortiert und mit den Ergebnissen aus der automatischen Sortierung verglichen werden.

Die in dieser Arbeit vorgestellten Algorithmen zur neuronalen Hauptkomponentenanalyse wurden unter MATLAB entwickelt. MATLAB bietet den Vorteil, dass neue Verfahren sehr schnell implementiert und untersucht werden können. Für eine optimale Ausnutzung vorhandener Speicher- und CPU-Ressourcen sollten die Algorithmen in C bzw. C++ umgesetzt werden. Bei der parallelen

Verarbeitung von sehr vielen Sensorsignalen kann sich daraus ein deutlicher Geschwindigkeitsvorteil ergeben. Rechenintensive Operationen könnten zudem auf die Grafikkarte als CUDA- oder OpenCL-Code ausgelagert werden.

Die untersuchten Algorithmen sollten modular und mit standardisierten Schnittstellen in die bereits vorhandenen Softwarekomponenten integriert werden, um eine einheitliche Steuerung und Auswertung der abgeleiteten Signale zu erzielen.

Auf der Seite der Hardware sind weiterhin neue Sensorgeometrien und -materialien erforderlich, die den Kontakt zwischen Zelle und Sensor verbessern und den Signalrauschabstand weiter vergrößern. Der geringe Signalrauschabstand bisheriger Systeme ist einer der Hauptgründe, weshalb automatische Verarbeitungsalgorithmen zu hohen Fehlerraten neigen und deshalb ein manuelles *Spike sorting* immer noch den Standard darstellt.

Literaturverzeichnis

- [1] Henry Markram. The Blue Brain Project. *Nature Reviews Neuroscience*, Bd. 7: S. 153–160, 2006.
- [2] Birgit Herden und Wolfgang Stielor. Geist in der Maschine. *Technology Review*, Bd. 1: S. 32–41, Januar 2006.
- [3] Eugene M. Izhikevich. *Dynamical Systems in Neuroscience: The Geometry of Excitability and Bursting*. The MIT Press, 2007.
- [4] John Graham Nicholls, A. Robert Martin und Bruce G. Wallace. *Vom Neuron zum Gehirn*. Gustav Fischer Verlag, 1995.
- [5] Peter Fromherz. Interfacing von Nervenzellen und Halbleiterchips. *Physikalische Blätter*, Bd. 57 (2): S. 43–48, 2001.
- [6] Edgar Douglas Adrian. *The Physical Background of Perception*. Clarendon Press, Oxford, 1946.
- [7] Warren S. McCulloch und Walter Pitts. A logical calculus of the ideas immanent in nervous activity. *Bulletin of Mathematical Biology*, Bd. 5: S. 115–133, 1943.
- [8] Andrew Fielding Huxley. The quantitative analysis of excitation and conduction in nerve. Nobel Lecture, Physiology or Medicine, Dezember 1963.
- [9] Erwin Neher und Bert Sakmann. Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres. *Nature*, Bd. 260: S. 799–802, 1976.
- [10] Erwin Neher, Bert Sakmann und Joe Henry Steinbach. The extracellular patch clamp: A method for resolving currents through individual open channels in biological membranes. *Pflügers Archiv European Journal of Physiology*, Bd. 375 (2): S. 219–228, Juli 1978.
- [11] O. P. Hamill, A. Marty, E. Neher, B. Sakmann und F. J. Sigworth. Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflügers Archiv European Journal of Physiology*, Bd. 391 (2): S. 85–100, August 1981.
- [12] C. A. Thomas, P. A. Springer, G. E. Loeb, Y. Berwald-Netter und L. M. Okun. A miniature microelectrode array to monitor the bioelectric activity of cultured cells. *Experimental Cell Research*, Bd. 74 (1): S. 61–66, September 1972.

- [13] Guenter W. Gross, E. Rieske, G. W. Kreutzberg und A Meyer. A new fixed-array multi-microelectrode system designed for long-term monitoring of extracellular single unit neuronal activity in vitro. *Neuroscience Letters*, Bd. 6 (2-3): S. 101–105, November 1977.
- [14] Guenter W. Gross. Simultaneous Single Unit Recording in vitro with a Photoetched Laser Deinsulated Gold Multimicroelectrode Surface. *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, Bd. 26 (5): S. 273–279, Mai 1979.
- [15] Guenter W. Gross, Walter Y. Wen und Jacob W. Lin. Transparent indium-tin oxide electrode patterns for extracellular, multisite recording in neuronal cultures. *Journal of Neuroscience Methods*, Bd. 15 (3): S. 243–252, November 1985.
- [16] Jerome Pine. Recording Action Potentials from Cultured Neurons with Extracellular Microcircuit Electrodes. *Journal of Neuroscience Methods*, Bd. 2: S. 19–31, 1980.
- [17] Johannes Jan Struijk. *Neuroprosthetics - Theory and Practice*, Kap. Passive Models of Excitable Cells, S. 3–29. World Scientific, 2004.
- [18] L. Berdondini, P. D. van der Wal, O. Guenat, N. F. de Rooij, M. Koudelka-Hep, P. Seitz, R. Kaufmann, P. Metzler, N. Blanc und S. Rohr. High-density electrode array for imaging in vitro electrophysiological activity. *Biosensors and Bioelectronics*, Bd. 21 (1): S. 167, 2005.
- [19] L. Berdondini, P. D. van der Wal, O. Guenat, N. F. de Rooij, M. Koudelka-Hep, P. Seitz, R. Kaufmann, P. Metzler, N. Blanc und S. Rohr. A microelectrode array (MEA) integrated with clustering structures for investigating in vitro neurodynamics in confined interconnected sub-populations of neurons. *Sensors and Actuators B: Chemical*, Bd. 114: S. 530–541, 2006.
- [20] Timothy J. Blanche, Martin A. Spacek, Jamille F. Hetke und Nicholas V. Swindale. Polytrodes: High-Density Silicon Electrode Arrays for Large-Scale Multiunit Recording. *Journal of Neurophysiology*, Bd. 93: S. 2987–3000, 2005.
- [21] M. Bove, S. Martinoia, G. Verreschi, M. Giugliano und M. Grattarola. Analysis of the signals generated by networks of neurons coupled to planar arrays of microtransducers in simulated experiments. *Biosensors and Bioelectronics*, Bd. 13 (6): S. 601, 1998.
- [22] Enric Claverol-Tinture und Jerome Pine. Extracellular potentials in low-density dissociated neuronal cultures. *Journal of Neuroscience Methods*, Bd. 117: S. 13–21, 2002.
- [23] Björn Eversmann, Martin Jenkner, Franz Hofmann, Christian Paulus, Ralf Brederlow, Birgit Holzapfl, Peter Fromherz, Matthias Merz, Markus Brenner, Matthias Schreiter, Reinhard Gabl, Kurt Plehnert, Michael Steinhauser, Gerald Eckstein, Doris Schmitt-Landsiedel und Roland Thewes. A 128 x 128 CMOS Biosensor Array for Extracellular Recording of Neural Activity. *IEEE Journal of solid-state circuits*, Bd. 38 (12): S. 2306–2317, 2003.
- [24] Wigand Poppendieck und Klaus-Peter Hoffmann. Nerven steuern Prothesen – Biologisch-technische Schnittstellen für die Neuroprothetik. *Elektronik*, Bd. 24: S. 62–67, 2008.

- [25] Richard B. North. Neural Interface Devices: Spinal Cord Stimulation Technology. *Proceedings of the IEEE*, Bd. 96 (7): S. 1108–1119, 2008.
- [26] Victor Pikov. Clinical Applications of Intraspinal Microstimulation. *Proceedings of the IEEE*, Bd. 96 (7): S. 1120–1128, 2008.
- [27] Mark A. Liker, Deborah S. Won, Vikas Y. Rao und Sherwin E. Hua. Deep Brain Stimulation: An Evolving Technology. *Proceedings of the IEEE*, Bd. 96 (7): S. 1129–1141, 2008.
- [28] Anrun Paul Amar, Michael L. Levy, Charles Y. Liu und Michael L. J. Apuzzo. Vagus Nerve Stimulation. *Proceedings of the IEEE*, Bd. 96 (7): S. 1142–1151, 2008.
- [29] Jiping He, Chaolin Ma und Richard Herman. Engineering Neural Interfaces for Rehabilitation of Lower Limb Function in Spinal Cord Injured. *Proceedings of the IEEE*, Bd. 96 (7): S. 1152–1166, 2008.
- [30] Chin-Teng Lin, Li-Wei Ko, Jin-Chern Chiou, Jeng-Ren Duann, Ruey-Song Huang, Sheng-Fu Liang, Tzai-Wen Chiu und Tzyy-Ping Jung. Noninvasive Neural Protheses Using Mobile and Wireless EEG. *Proceedings of the IEEE*, Bd. 96 (7): S. 1167–1183, 2008.
- [31] Kensall D. Wise, Amir M. Sodagar, Ying Yao, Mayurachat Ning Gulari, Gayantri E. Perlin und Khalil Najafi. Microelectrodes, Microelectronics, and Implantable Neural Microsystems. *Proceedings of the IEEE*, Bd. 96 (7): S. 1184–1202, 2008.
- [32] Reid R. Harrison. The Design of Integrated Circuits to Observe Brain Activity. *Proceedings of the IEEE*, Bd. 96 (7): S. 1203–1216, 2008.
- [33] Jürg Streit. Regular Oscillations of Synaptic Activity in Spinal Networks In Vitro. *Journal of Neurophysiology*, Bd. 70 (3): S. 871–878, September 1993.
- [34] Guenter W. Gross, Annette Harsch, Barry K. Rhoades und Wolfgang Göpel. Odor, drug and toxin analysis with neuronal networks in vitro: extracellular array recording of network responses. *Biosensors and Bioelectronics*, Bd. 12 (5): S. 373–393, 1997.
- [35] Guenter W. Gross, Barry K. Rhoades, Hassan M. E. Azzazy und Ming-Chi WuG. The use of neuronal networks on multielectrode arrays as biosensors. *Biosensors and Bioelectronics*, Bd. 10: S. 553–567, 1995.
- [36] Alexandra Gramowski, Konstantin Jügelt, Dieter G. Weiss und Guenter W. Gross. Substance identification by quantitative characterization of oscillatory activity in murine spinal cord networks on microelectrode arrays. *European Journal of Neuroscience*, Bd. 19 (10): S. 2815–2825, Mai 2004.
- [37] Mirko Lehmann und Werner Baumann. New insights into the nanometer-scaled cell-surface interspace by cell-sensor measurements. *Experimental Cell Research*, Bd. 305 (2): S. 374, 2005.

- [38] S.I. Morefield, E.W. Keefer, K.D. Chapman und G.W. Gross. Drug evaluations using neuronal networks cultured on microelectrode arrays. *Biosensors and Bioelectronics*, Bd. 15: S. 383–396, 2000.
- [39] David A. Stenger, Guenter W. Gross, Edward W. Keefer, Kara W. Shaffer, Joanne D. Andreadis, Wu Ma und Joseph J. Pacrazio. Detection of physiologically active compounds using cell-based biosensors. *Trends in Biotechnology*, Bd. 19 (8): S. 304–309, 2001.
- [40] Alfred Stett, Ulrich Egert, Elke Guenther, Frank Hofmann, Thomas Meyer, Wilfried Nisch und Hugo Hämmerle. Biological application of microelectrode arrays in drug discovery and basic research. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, Bd. 377: S. 486–495, 2003.
- [41] David H. Freedman. Versuchskaninchen aus Silizium. *Technology Review*, Bd. 7: S. 44–48, 2004.
- [42] Franz Miller. Schneller zum besseren Medikament. *Fraunhofer Magazin*, Bd. 3: S. 8–12, 2004.
- [43] Robert Hermann. Arzneien effizient entwickeln. *Fraunhofer Magazin*, Bd. 3: S. 13, 2004.
- [44] Amanda Schupak. The Bunny Chip. *Forbes Magazine*, Bd. 8: S. 53–54, 2005.
- [45] Roxanne Khamsi. Meet the stripped down rat. *Nature*, Bd. 435: S. 12–13, 2005.
- [46] David H. Freedman. The Silicon Guinea Pig. *Technology Review*, Bd. 131: S. 62–68, 2004.
- [47] Peter Weiss. Frankenstein's Chips. *Science News*, Bd. 167: S. 24–26, 2005.
- [48] Guido Krause. *Monitoring of electrophysiological and metabolic activity of neuronal networks with CMOS chip technology*. Dissertation, Universität Rostock, Oktober 2005.
- [49] Volker Stollorz. Der Schock im Testlabor. *Frankfurter Allgemeine Sonntagszeitung*, Bd. 11: S. 69, 2006.
- [50] Izhar Bar-Gad, Gali Heimer, Ya'acov Ritov und Hagai Bergman. Functional Correlations between Neighboring Neurons in the Primate Globus Pallidus are Weak or Nonexistent. *The Journal of Neuroscience*, Bd. 23: S. 4012–4016, 2003.
- [51] Izhar Bar-Gad, Ya'acov Ritov, Eilon Vaadia und Hagai Bergman. Failure in identification of overlapping spikes from multiple neuron activity causes artificial correlations. *Journal of Neuroscience Methods*, Bd. 107 (1-2): S. 1–13, 2001.
- [52] Jonathan Erickson, Gary Chow, Angela Tooker, Y-C. Tai und Jerome Pine. Progress on the Caged-Neuron MEA Project. In *5th International Meeting on Substrate-Integrated Microelectrodes*, S. 192–193. 2006.
- [53] Jonathan Erickson, Angela Tooker, Y-C. Tai und Jerome Pine. Caged neuron MEA: A system for long-term investigation of cultured neural network connectivity. *Journal of Neuroscience Methods*, Bd. 175: S. 1–16, 2008.

- [54] Te-Won Lee, Michael S. Lewicki und Terrence J. Sejnowski. ICA Mixture Models for Unsupervised Classification of Non-Gaussian Sources and Automatic Context Switching in Blind Signal Separation. *IEEE Transactions on Pattern Recognition and Machine Intelligence*, Bd. 22 (10): S. 1–12, 2000.
- [55] Jean-Francois Cardoso. Blind signal separation: statistical principles. *Proceedings of the IEEE*, Bd. 86 (10): S. 2009–2025, 1998.
- [56] Michael S. Lewicki. A review of methods for spike sorting: the detection and classification of neural action potentials. *Network: Computation in Neural Systems*, Bd. 9 (4): S. R53–R78, 1998. 0954-898x Journal Article Review Review, Tutorial.
- [57] Carl Gold, Darrell A. Henze, Christof Koch und György Buzsáki. On the Origin of the Extracellular Action Potential Waveform: A Modeling Study. *Journal of Neurophysiology*, Bd. 95: S. 3113–3128, 2006.
- [58] Alexander G. Dimitrov. Spike sorting the other way. *Neurocomputing*, Bd. 52–54: S. 741, 2003.
- [59] Kenneth D. Harris, Darrell A. Henze, Jozsef Csicsvari, Hajime Hirase und György Buzsáki. Accuracy of Tetrode Spike Separation as Determined by Simultaneous Intracellular and Extracellular Measurements. *Journal of Neurophysiology*, Bd. 84 (1): S. 401–414, 2000.
- [60] Joseph J. Pancrazio, J. P. Whelan, David A. Borkholder, W. Ma und David A. Stenger. Development and Application of Cell-Based Biosensors. *Annals of Biomedical Engineering*, Bd. 27: S. 697–711, 1999.
- [61] Christiane Ziegler. Cell-based biosensors. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*, Bd. 366 (6-7): S. 552–559, März 2000.
- [62] Brian R. Eggins. *Chemical Sensors and Biosensors*. Wiley & Sons, 2002.
- [63] Robert S. Marks, Christopher R. Lowe, David C. Cullen, Howard H. Weetall und Isao Karube. *Handbook of Biosensors and Biochips*. Wiley & Sons, 2007.
- [64] Bert Sakmann. Unit current response in chemically and electrically excitable cell membranes. *Pflügers Archiv European Journal of Physiology*, Bd. 394 (1): S. R3, März 1982.
- [65] John Dunlop, Mark Bowlby, Ravikumar Peri, Dmytro Vasilyev und Robert Arias. High-throughput electrophysiology: an emerging paradigm for ion-channel screening and physiology. *Nature*, Bd. 7: S. 358–368, 2008.
- [66] Peter Fromherz und Alfred Stett. Silicon-Neuron Junction: Capacitive Stimulation of an Individual Neuron on a Silicon Chip. *Physical Review Letters*, Bd. 75 (8): S. 1670–1673, 1995.
- [67] Peter Fromherz. *Nanoelectronics and Information Technology*, Kap. Neuroelectronic Interfacing: Semiconductor Chips with Ion Channels, Nerve Cells, and Brain, S. 781–810. Wiley-VCH Berlin, 2003.

- [68] Peter Fromherz. Semiconductor chips with ion channels, nerve cells and brain. *Physica E*, Bd. 16: S. 24–34, 2003.
- [69] Michael D. Linderman, Gopal Santhanam, Caleb Kemere, Vikash Gilja, Stephen O’Driscoll, Byron M. Yu, Afsheen Afshar, Stephen I. Ryu, Krishna V. Shenoy und Teresa H. Meng. Signal Processing Challenges for Neural Prostheses. *IEEE Signal Processing Magazine*, Bd. 25 (1): S. 18–28, 2008.
- [70] Kyung Hwan Kim und Sung June Kim. Neural spike sorting under nearly 0-dB signal-to-noise ratio using nonlinear energy operator and artificial neural-network classifier. *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, Bd. 47 (10): S. 1406–1411, 2000.
- [71] Edward M. Schmidt. Instruments for sorting neuroelectric data: a review. *Journal of Neuroscience Methods*, Bd. 12 (1): S. 1–24, 1984.
- [72] Guenter W. Gross, Ann N. Williams und Jen H. Lucas. Recording of spontaneous activity with photoetched microelectrode surfaces from mouse spinal neurons in culture. *Journal of Neuroscience Methods*, Bd. 5 (1-2): S. 13–22, Januar 1982.
- [73] Detlef Heck. Investigating dynamic aspects of brain function in slice preparations: spatio-temporal stimulus patterns generated with an easy-to-build multi-electrode array. *Journal of Neuroscience Methods*, Bd. 58 (1-2): S. 81, 1995.
- [74] Jean-Pierre Poindessault, Christophe Beauquin und Frédéric Gaillard. Stimulation, data acquisition, spike detection and time/rate analysis with a graphical programming system: an application to vision studies. *Journal of Neuroscience Methods*, Bd. 59: S. 225–235, 1995.
- [75] Yasuhiko Jimbo, Nahoko Kasai, Keiichi Torimitsu, Takashi Tateno und Hugh P. C. Robinson. A System for MEA-Based Multisite Stimulation. *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, Bd. 50 (2): S. 241–248, 2003.
- [76] Daniel A. Wagenaar, Jerome Pine und Steve M. Potter. Effective parameters for stimulation of dissociated cultures using multi-electrode arrays. *Journal of Neuroscience Methods*, Bd. 138 (1-2): S. 27–45, 2004.
- [77] Daniel A Wagenaar und Steve M Potter. A versatile all-channel stimulator for electrode arrays, with real-time control. *Journal of Neural Engineering*, Bd. 1 (1): S. 39–45, 2004.
- [78] Zenas C. Chao, Douglas J. Bakkum, Daniel A. Wagenaar und Steve M. Potter. Effects of Random External Background Stimulation on Network Synaptic Stability After Tetanization. *Neuroinformatics*, Bd. 3 (3): S. 263–280, 2005.
- [79] Roy H. Olsson, Derek L. Buhl, Anton M. Sirota, György Buzsáki und Kensall D. Wise. Band-Tunable and Multiplexed Integrated Circuits for Simultaneous Recording and Stimulation With Microelectrode Arrays. *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, Bd. 52 (7): S. 1303–1311, 2005.

- [80] Yoonkey Nam, Bruce C. Wheeler und Marc O. Heuschkel. Neural recording and stimulation of dissociated hippocampal cultures using microfabricated three-dimensional tip electrode array. *Journal of Neuroscience Methods*, Bd. 155 (2): S. 296–299, September 2006.
- [81] Flavio Heer, Sadik Hafizovic, Wendy Franks, Urs Frey, Frauke Greve, Axel Blau, Tanja Ugniwenko, Christiane Ziegler und Andreas Hierlemann. CMOS Integrated Bidirectional 128-Electrode Array for Electrogenic Cells. In *5th International Meeting on Substrate-Integrated Micro Electrode Arrays*, S. 212–213. 2006.
- [82] Edgar A. Brown, Richard A. Blum, James D. Ross, Yoonkey Nam, Bruce C. Wheeler und Stephen P. DeWeerth. An Integrated System for Simultaneous Multichannel Stimulation and Recording. In *5th International Meeting on Substrate-Integrated Micro Electrode Arrays*, S. 206–207. 2006.
- [83] James L. Novak und Bruce C. Wheeler. Recording from the Aplysia Abdominal Ganglion with a Planar Microelectrode Array. *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, Bd. BME-33 (2): S. 196–202, 1986.
- [84] Wade G. Regehr, Jerome Pine, Christopher S. Cohan, Michelle D. Mischke und David W. Tank. Sealing cultured invertebrate neurons to embedded dish electrodes facilitates long-term stimulation and recording. *Journal of Neuroscience Methods*, Bd. 30 (2): S. 91–106, 1989.
- [85] P. Connolly, P. Clark, A.S.G. Curtis, J.A.T. Dow und C.D.W Wilkinson. An Extracellular microelectrode Array for monitoring electrogenic cells in culture. *Biosensors and Bioelectronics*, Bd. 5 (3): S. 223–234, 1990.
- [86] W. Nisch, J. Böck, U. Egert, H. Hämmerle und A. Mohr. A thin film microelectrode array for monitoring extracellular neuronal activity in vitro. *Biosensors and Bioelectronics*, Bd. 9 (9-10): S. 737–741, 1994.
- [87] Hiroaki Oka, Ken Shimono, Ryuta Ogawa, Hirokazu Sugihara und Makoto Taketani. A new planar multielectrode array for extracellular recoding: application to hippocampal acute slice. *Journal of Neuroscience Methods*, Bd. 93: S. 61–67, 1999.
- [88] Angela Tooker, Ellis Meng, Jon Erickson, Yu-Chong Tai und Jerry Pine. Development of biocompatible parylene neurocages. *26th Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society, IEMBS '04.*, Bd. 1: S. 2542–2545, 2004.
- [89] Urs Frey, U. Egert, F. Heer, S. Hafizovic und A. Hierlemann. Microelectronic system for high-resolution mapping of extracellular electric fields applied to brain slices. *Biosensors and Bioelectronics*, Bd. 24 (7): S. 2191–2198, 2009.
- [90] Peter Fromherz. Joining Ionics and Electronics: Semiconductor Chips with Ion Channels, Nerve Cells, and Brain Tissue. In *2005 IEEE International Solid-State Circuits Conference*, S. 76–77. 2005.

- [91] A. Lambacher, M. Jenkner, Matthias Merz, B. Eversmann, R. A. Kaul, F. Hofman, R. Thewes und Peter Fromherz. Electrical imaging of neuronal activity by multi-transistor-array (MTA) recording at 7.8 μ m resolution. *Applied Physics A: Materials Science and Processing*, Bd. 79 (7): S. 1607–1611, November 2004.
- [92] Mathias Schindler, Sven Meyburg, Günter Wrobel, Sven Ingebrandt und Andreas Offenhäusser. Design of floating-gate field-effect transistor arrays for the bi-directional coupling with electrogenic cells. In *5th International Meeting on Substrate-Integrated Microelectrodes*, S. 216–217. 2006.
- [93] Sven Meyburg, Michael Goryll, Jürgen Moers, Sven Ingebrandt, Simone Böcker-Meffert, Hans Lüth und Andreas Offenhäusser. N-Channel field-effect transistors with floating gates for extracellular recordings. *Biosensors and Bioelectronics*, Bd. 21: S. 1037–1044, 2006.
- [94] Fabrice O. Morin, Yuzuru Takamura und Eiichi Tamiya. Investigating Neuronal Activity with Planar Microelectrode Arrays: Achievements and New Perspectives. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, Bd. 100 (2): S. 131–143, 2005.
- [95] Christoph Sprössler, Dirk Richter, Morgan Denyer und Andreas Offenhäusser. Long-term recording system based on field-effect transistor arrays for monitoring electrogenic cells in culture. *Biosensors and Bioelectronics*, Bd. 13: S. 613–618, 1998.
- [96] Peter Fromherz, Carsten O. Müller und Rolf Weis. Neuron transistor: Electrical transfer function measured by the patch-clamp technique. *Physical Review Letter*, Bd. 71 (24): S. 4079–4082, 1993.
- [97] Andreas Offenhäusser, Christoph Sprössler, Mieko Matsuzawa und Wolfgang Knoll. Field-Effect transistor array for monitoring electrical activity from mammalian neurons in culture. *Biosensors and Bioelectronics*, Bd. 12 (8): S. 819–826, 1997.
- [98] Sven Meyburg, Michael Goryll, Jürgen Moers, Hans Lüth, S. Ingebrandt und A. Offenhäusser. Floating Gate Transistors for Cell Coupling. In *4th International Meeting on Substrate-Integrated Microelectrodes*. 2004.
- [99] Sven Meyburg, Günter Wrobel, Regina Stockmann, Jürgen Moers, Sven Ingebrandt und Andreas Offenhäusser. Single cell recordings with pairs of complementary transistors. *Applied Physics Letters*, Bd. 89: S. 013901, 2006.
- [100] H. Ecken, S. Ingebrandt, M. Krause, D. Richter, M. Hara und A. Offenhäusser. 64-Channel extended gate electrode arrays for extracellular signal recording. *Electrochimica Acta*, Bd. 48: S. 3355–3362, 2003.
- [101] S. Ingebrandt, Günter Wrobel, M. Pabst, Sven Meyburg und A. Offenhäusser. Towards a new model for the cell-sensor contact. In *4th International Meeting on Substrate-Integrated Microelectrode Arrays*. 2004.

- [102] R. Thewes, C. Paulus, M. Schienle, F. Hofmann, A. Frey, R. Brederlow, M. Augustyniak, M. Jenkner, B. Eversmann, P. Schindler-Bauer, M. Atzesberger, B. Holzapfl, G. Beer, T. Haneder und H.-C. Hanke. CMOS-based Biosensor Arrays. In *IEEE Design, Automation and Test in Europe Conference and Exhibition (DATE 2005)*, Bd. 2, S. 1222–1223. IEEE Computer Society, 2005.
- [103] U. Yegin, M. Schindler, S. Ingebrandt, S. Eick, S. K. Kim, C. S. Hwang, C. Schindler und A. Offenhäusser. Function Principle of a CMOS Pixel Array for Bidirectional Communication with Individual Cells. In *6th International Meeting on Substrate-Integrated Microelectrodes*, S. 343–344. 2008.
- [104] P. Bergveld. Thirty years of ISFETOLOGY – What happened in the past 30 years and what may happen in the next 30 years. *Sensors and Actuators B: Chemical*, Bd. 88 (1): S. 1–20, Januar 2003.
- [105] S. Vassanelli und Peter Fromherz. Neurons from rat brain coupled to transistors. *Applied Physics A: Materials Science and Processing*, Bd. 65: S. 85–88, 1997.
- [106] Rolf Weis und Peter Fromherz. Frequency dependent signal transfer in neuron transistors. *Physical Review E*, Bd. 55 (1): S. 877–889, 1997.
- [107] Martin Jenkner, Bernt Müller und Peter Fromherz. Interfacing a silicon chip to pairs of snail neurons connected by electrical synapses. *Biological Cybernetics*, Bd. 84: S. 239–249, 2001.
- [108] Richard Schätzthauer und Peter Fromherz. Neuron–silicon junction with voltage-gated ionic currents. *European Journal of Neuroscience*, Bd. 10 (6): S. 1956–1962, 2001.
- [109] Michael Hutzler und Peter Fromherz. Silicon chip with capacitors and transistors for interfacing organotypic brain slice of rat hippocampus. *Journal of Neuroscience*, Bd. 19: S. 2231–2238, 2004.
- [110] C. C. Hermann, R. Zeitler, R. Thewes und P. Fromherz. Functional Analysis of Cultured Hippocampal Slices with Multi-Transistor Array at High Resolution. In *6th International Meeting on Substrate-Integrated Microelectrodes*, S. 301. 2008.
- [111] R. Ehret, W. Baumann, M. Brischwein, M. Lehmann, T. Henning, I. Freund, S. Drechsler, U. Friedrich, M.-L. Hubert, E. Motrescu, A. Kob, H. Palzer, H. Grothe und B. Wolf. Multi-parametric microsensors for screening applications. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*, Bd. 369: S. 30–35, 2001.
- [112] Bernhard Wolf, Michael Kraus und Ulrich Sieben. Potential of microsensors-based feedback bioactuators for biophysical cancer treatment. *Biosensors and Bioelectronics*, Bd. 12 (4): S. 301–309, 1997.

- [113] Bernhard Wolf, Martin Brischwein, Werner Baumann, Ralf Ehret und Michael Kraus. Monitoring of cellular signalling and metabolism with modular sensor-technique: The PhysioControl-Microsystem (PCM(R)). *Biosensors and Bioelectronics*, Bd. 13 (5): S. 501–509, 1998.
- [114] Bernhard Wolf, Michael Kraus, Martin Brischwein, Ralf Ehret, Werner Baumann und Mirko Lehmann. Biofunctional hybrid structures–cell-silicon hybrids for applications in biomedicine and bioinformatics. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics*, Bd. 46 (2): S. 215–225, 1998.
- [115] Bernhard Wolf, Martin Brischwein, Werner Baumann, Ralf Ehret, Tobias Henning, Mirko Lehmann und Anne Schwinde. Microsensor-Aided Measurements of Cellular Signalling and Metabolism on Tumor Cells - The Cell Monitoring System (CMS). *Tumor Biology*, Bd. 19: S. 374–383, 1998.
- [116] Mirko Lehmann, Werner Baumann, Martin Brischwein, Ralf Ehret, Michael Kraus, Anne Schwinde, Matthias Bitzenhofer, Ingo Freund und Bernhard Wolf. Non-invasive measurement of cell membrane associated proton gradients by ion-sensitive field effect transistor arrays for microphysiological and bioelectrical applications. *Biosensors and Bioelectronics*, Bd. 15 (3-4): S. 117, 2000.
- [117] Mirko Lehmann, Werner Baumann, Martin Brischwein, Hans-Jurgen Gahle, Ingo Freund, Ralf Ehret, Sabine Drechsler, Heiko Palzer, Martin Kleintges, Ullrich Sieben und Bernhard Wolf. Simultaneous measurement of cellular respiration and acidification with a single CMOS ISFET. *Biosensors and Bioelectronics*, Bd. 16 (3): S. 195, 2001.
- [118] Luca Berdondini, Kilian Imfeld, Alessandro Maccione, Mariateresa Tedesco, Simon Neukom, Milena Koudelka-Hep und Sergio Martinoia. Active pixel sensor array for high spatiotemporal resolution electrophysiological recordings from single cell to large scale neuronal networks. *Lab on a Chip*, Bd. 9: S. 2644–2651, 2009.
- [119] L. Berdondini, P. Massobrio, M. Chiappalone, M. Tedesco, K. Imfeld, A. Maccione, M. Gandolfo, M. Koudelka-Hep und S. Martinoia. Extracellular recordings from locally dense microelectrode arrays coupled to dissociated cortical cultures. *Journal of Neuroscience Methods*, Bd. 177 (2): S. 386–396, 2009.
- [120] Kilian Imfeld. *Acquisition System and Signal Processing for Large-Scale High-Resolution Microelectrode Arrays Neurointerfaces*. Dissertation, Université de Neuchâtel, Faculté des sciences, 2008.
- [121] Kilian Imfeld, Luca Berdondini, Alessandro Maccione, Sergio Martinoia, Pierre-André Farine und Milena Koudelka-Hep. Hardware-based real-time signal processing for high-density MEA systems. In *6th International Meeting on Substrate-Integrated Microelectrodes*, S. 306–307. 2008.

- [122] K. Imfeld, A. Maccione, M. Gandolfo, S. Martinoia, P.-A. Farine, M. Koudelka-Hep und L. Berdondini. Real-time signal processing for high-density microelectrode array systems. *International Journal of Adaptive Control and Signal Processing*, Bd. n/a: S. n/a, 2008.
- [123] Kilian Imfeld, Simon Neukom, Alessandro Maccione, Yannick Bornat, Sergio Martinoia, Pierre-André Farine, Milena Koudelka-Hep und Luca Berdondini. Large-Scale, High-Resolution Data Acquisition System for Extracellular Recording of Electrophysiological Activity. *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, Bd. 55 (8): S. 2064–2073, 2008.
- [124] A. Maccione, F. Benfenati, L. Berdondini, M. Gandolfo, M. Tedesco, S. Martinoia, K. Imfeld und M. Koudelka-Hep. Imaging extracellular neuronal signaling on high resolution microelectrode arrays (MEAs) Hippocampal cultures coupled with a high resolution neuroelectronic interface. In *4th International IEEE/EMBS Conference on Neural Engineering*, S. 234–237. 2009.
- [125] Paolo Massobrio, Sergio Martinoia, Luca Berdondini, Kilian Imfeld, Milena Koudelka-Hep, André Garenne und Gwendal Le Masson. Recording electrophysiological activity by means of high density MEAs: theoretical models, extracellular signal simulations and measurements. In *5th International Meeting on Substrate-Integrated Micro Electrode Arrays*, S. 226–227. 2006.
- [126] Wendy Franks, Flavio Heer, I. McKay, S. Taschini, R. Sunier, C. Hagleitner, Andreas Hierlemann und Henry Baltes. 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, S. 963–966. IEEE, 2003.
- [127] Flavio Heer, Wendy Franks, Axel Blau, S. Taschini, Christiane Ziegler, Andreas Hierlemann und Henry Baltes. CMOS microelectrode array for the monitoring of electrogenic cells. *Biosensors and Bioelectronics*, Bd. 20: S. 358–366, 2004.
- [128] Henry Baltes, Axel Blau, Paolo Bonifazi, Karl Brander, Olivier Dubochet, Wendy Franks, Frauke Greve, Sadik Hafizovic, Flavio Heer, Thomas Hessler, Andreas Hierlemann, Barbara Kochte-Clemens, Sander Koster, Tobias Kraus, Christiane Leister, Nicolaas F. de Rooij, Elisabetta Ruaro, Vincent Torre und Christiane Ziegler. A New Platform for Studying Information Processing by Natural Neural Networks. In *4th International Meeting on Substrate-Integrated Microelectrode Arrays*. 2004.
- [129] Sadik Hafizovic, Flavio Heer und Andreas Hierlemann. Signal Processing Chain for CMOS Microelectrode Arrays Interfaced to Electrogenic Cells. In *5th International Meeting on Substrate-Integrated Microelectrode Arrays*, S. 210–211. 2006.
- [130] Andreas Hierlemann, Urs Frey, Sadik Hafizovic und Flavio Heer. CMOS-based bioelectronics and microelectrode Arrays. In *6th International Meeting on Substrate-Integrated Micro Electrode Arrays*, S. 238–241. 2008.

- [131] Urs Frey, U. Egert, J. Sedivy, F. Heer, S. Hafizovic und A. Hierlemann. High-Resolution CMOS-based Microelectrode Array and its Application to Acute Slice Preparations. In *6th International Meeting on Substrate-Integrated Microelectrodes*, S. 291–292, 2008.
- [132] Flavio Heer, Sadik Hafizovic, Wendy Franks, Axel Blau, Christiane Ziegler und Andreas Hierlemann. CMOS Microelectrode Array for Bidirectional Interaction with Neuronal Networks. *IEEE Journal of Solid-State Circuits*, Bd. 41: S. 1620–1629, 2006.
- [133] Tobias Kraus, Elisabeth Verpoorte, Vincent Linder, Wendy Franks, Andreas Hierlemann, Flavio Heer, Sadik Hafizovic, Teruo Fujii, Nico F. de Rooij und Sander Koster. Characterization of a microfluidic dispensing system for localised stimulation of cellular networks. *Lab on a Chip*, Bd. 6: S. 218–229, 2006.
- [134] Paolo Ariano, Alessandro Lo Guidice, Andrea Marcantoni, Ettore Vittone, Emilio Carbone und Davide Lovisolo. A diamond-based biosensor for the recording of neuronal activity. *Biosensors and Bioelectronics*, Bd. 24: S. 2046–2050, 2009.
- [135] Eshel Ben-Jacob und Yael Hanein. Carbon nanotube micro-electrodes for neuronal interfacing. *Journal of Materials Chemistry*, Bd. 18: S. 5181–5186, 2008.
- [136] Tamir Gabay, Moti Ben-David, Itshak Kalifa, Raya Sorkin, Ze'ev R. Abrams, Eshel Ben-Jacob und Yael Hanein. Electro-chemical and biological properties of carbon nanotube based multi-electrode arrays. *Nanotechnology*, Bd. 18: S. 035201 (6pp), 2007.
- [137] Tamir Gabay, Eyal Jakobs, Eshel Ben-Jacob und Yael Hanein. Engineered self-organization of neural networks using carbon nanotube clusters. *Physica A: Statistical Mechanics and its Applications*, Bd. 350 (2–4): S. 611–621, 2005.
- [138] Edward W. Keefer, Barry R. Botterman, Mario I. Romero, Andrew F. Rossi und Guenter W. Gross. Carbon nanotube coating improves neuronal recordings. *Nature Nanotechnology*, Bd. 3: S. 434–439, 2008.
- [139] Asaf Shoval, Christopher Adams, Moshe David-Pur, Mark Shein, Yael Hanein und Evelyne Sernagor. Carbon Nanotube Electrodes for Effective Interfacing with Retinal Tissue. *Frontiers in Neuroengineering*, Bd. 2: S. 1–8, 2009.
- [140] M. David-Pur, C. Adams, E. Sernagor, R. Sorkin, A. Greenbaum, M. Shein, E. Ben-Jacob und Y. Hanein. Carbon Nanotube Based MEA for Retinal Interfacing Applications. In *6th International Meeting on Substrate-Integrated Microelectrodes*, S. 251–254, 2008.
- [141] Wendy Franks, Iwan Schenker, Patrik Schmutz und Andreas Hierlemann. Impedance Characterization and Modelling of Electrodes for Biomedical Applications. *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, Bd. 52: S. 1295–1302, 2005.

- [142] J.D. Weiland, D.J. Anderson und M.S. Humayun. In vitro electrical properties for iridium oxide versus titanium nitride stimulating electrodes. *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, Bd. 49: S. 1574–1579, 2002.
- [143] Michael P. Maher, Jerome Pine, John Wright und Yu-Chong Tai. The neurochip: a new multielectrode device for stimulating and recording from cultured neurons. *Journal of Neuroscience Methods*, Bd. 87: S. 45–56, 1999.
- [144] Yoonkey Nam, Darren W. Branch und Bruce C. Wheeler. Epoxy-silane linking of biomolecules is simple and effective for patterning neuronal cultures. *Biosensors and Bioelectronics*, Bd. 22: S. 589–597, 2006.
- [145] Jon Erickson, Angela Tooker, Yu-Chong Tai und Jerry Pine. First Network Studies With the Charged-Neuron Multielectrode Array. In *6th International Meeting on Substrate-Integrated Microelectrodes*, S. 287–288. 2008.
- [146] Angela Tooker, Ellis Meng, Jon Erickson, Yu-Chong Tai und Jerry Pine. Biocompatible Parylene Neurocages – Developing A Robust Method for Live Neural Network Studies. *IEEE Engineering in Medicine and Biology Magazine*, Bd. 24 (6): S. 30–33, 2005.
- [147] Carsten Tautorat, Philipp Julian Koester, Angela Podssun, Helmut Beikirch, Jan Gimsa, Ludwig Jonas und Werner Baumann. Local micro-invasive needle electroporation – A technical challenge. In *6th International Meeting on Substrate-Integrated Microelectrodes*, S. 346–347. 2008.
- [148] Philipp Julian Koester, Carsten Tautorat, Angela Podssun, Jan Gimsa, Ludwig Jonas und Werner Baumann. A new principle for intracellular potential measurements of adherently growing cells. In *6th. International Meeting on Substrate-Integrated Microelectrodes*, S. 274–277. 2008.
- [149] Jochen Held, Joao Gaspar, Patrick Ruther und Oliver Paul. Microneedle electrode array with dielectrophoresis electrodes for intracellular recording applications. In *6th International Meeting on Substrate-Integrated Microelectrodes*, S. 299–300. 2008.
- [150] Quing Bai, Kensall D. Wise und David J. Anderson. A High-Yield Microassembly Structure For Three-Dimensional Microelectrode Arrays. *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, Bd. 47: S. 281–289, März 2000.
- [151] Quing Bai und Kensall D. Wise. Single-Unit Neural Recording with Active Microelectrode Arrays. *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, Bd. 48 (8): S. 911–920, August 2001.
- [152] Marc Olivier Heuschkel, Michael Fejtl, Mario Raggenbass, Daniel Bertrand und Philippe Renaud. A three-dimensional multi-electrode array for multi-site stimulation and recording in acute brain slices. *Journal of Neuroscience Methods*, Bd. 114: S. 135–148, 2002.

- [153] Dries Braeken, Danny Jans, Danielle Rand, Bart Van Meerbergen, Roeland Huys, Josine Loo, Geet Callewaert, Gustaaf Borghs und Carmen Bartic. Micronail-structured micro electrode array for selective local stimulation of excitable cells. In *6th. International Meeting on Substrate-Integrated Microelectrodes*, S. 257–260. 2008.
- [154] G. Charvet, O. Billoint, M. Colin, H. Fanet, S. Gharbi, F. Goy, R. Guillemaud, S. Joucla, B. Mercier, P. Meyrand, J.P. Rostaing, L. Rousseau, M. Trevisiol und B. Yvert. BioMEA: A 256-channel microelectrode array (MEA) system with integrated electronics for recording and stimulation of neural networks. In *6th International Meeting on Substrate-Integrated Microelectrodes*, S. 286–287. 2008.
- [155] Neil Joye, Alexandre Schmid und Yusuf Leblebici. Three-Dimensional silicon-based MEA with high spatial resolution. In *6th International Meeting on Substrate-Integrated Micro Electrode Arrays*, S. 320–321. 2008.
- [156] J. Held, J. Gaspar, P.J. Koester, C. Tautorat, M. Hagner, A. Cismak, A. Heilmann, W. Baumann, P. Ruther und O. Paul. Hollow Microneedle Electrode Arrays for Intracellular Recording Applications. In *IEEE 22nd International Conference on Micro Electro Mechanical Systems*. 2009.
- [157] Laura Rowe, Mahmoud Almasri, Kil Lee, Nick Fogleman, Gregory J. Brewer, Yoonkey Nam, Bruce C. Wheeler, Jelena Vukasinovic, Ari Glezer, und A. Bruno Frazier. Active 3-D microcaffold system with fluid perfusion for culturing in vitro neuronal networks. *Lab on a Chip*, Bd. 7: S. 475–482, 2007.
- [158] Florian Ilchmann, Johann Ressler, Jochen Meyer, Helmut Grothe und Bernhard Wolf. Recording chamber for glass sensor chips with MEA and integrated oxygen-, pH- and temperature sensors. In *5th International Meeting on Substrate-Integrated Microelectrodes*, S. 222–223. 2006.
- [159] Florian Ilchmann, Jochen Meyer, Volker Lob, Chen Zhang, Helmut Grothe und Bernhard Wolf. Automated multiparametric 24 Well Neuro Screening system. In *6th International Meeting on Substrate-Integrated Microelectrodes*, S. 302–303. 2008.
- [160] Y. Perelman und R Ginosar. An Integrated System for Multichannel Neuronal Recording with Spike / LFP Separation and Digital Output. In *2nd International IEEE EMBS Conference on Neural Engineering*, S. 377–380. 2005.
- [161] Yevgeny Perelman und Ran Ginosar. Analog frontend for multichannel neuronal recording system with spike and LFP separation. *Journal of Neuroscience Methods*, Bd. 153: S. 21–26, 2006.
- [162] Yevgeny Perelman und Ran Ginosar. *The NeuroProcessor – An Integrated Interface to Biological Neural Networks*. Springer Netherlands, 2008.

- [163] Ziv Yekutieli, Yevgeny Perelman, Ran Ginosar und Shimon Marom. A Multichannel Recording Frontend for MEA. In *5th International Meeting on Substrate-Integrated Micro Electrode Arrays*, S. 214–215. 2006.
- [164] Ziv Yekutieli. *Integrated Multi-Electrode Array: An interface to ex vivo neural networks*. Diplomarbeit, Israel Institute of Technology, Department of Electrical Engineering, 2007.
- [165] John A. White, Jay T. Rubinstein und Alan R. Kay. Channel noise in neurons. *Trends in Neuroscience*, Bd. 23: S. 131–137, 2000.
- [166] Michale S. Fee, Partha P. Mitra und David Kleinfeld. Variability of Extracellular Spike Waveforms of Cortical Neurons. *Journal of Neurophysiologie*, Bd. 76 (6): S. 3823–3833, Dezember 1996.
- [167] D.A. Robinson. The electrical properties of metal microelectrodes. *Proceedings of the IEEE*, Bd. 56 (6): S. 1065–1071, Juni 1968.
- [168] Rodrigo Quian Quiroga, Z. Nadasdy und Y. Ben-Shaul. Unsupervised spike detection and sorting with wavelets and superparamagnetic clustering. *Neural Computation*, Bd. 16 (8): S. 1661–1687, 2004.
- [169] Alexander B. Wiltschko, Gregory J. Gage und Joshua D. Berke. Wavelet filtering before spike detection preserves waveform shape and enhances single-unit discrimination. *Journal of Neuroscience Methods*, Bd. 173 (1): S. 34–40, August 2008.
- [170] David L. Donoho. De-noising by Soft-Thresholding. *IEEE Transactions on Information Theory*, Bd. 41 (3): S. 613–627, 1995.
- [171] Alexey Smirnov und Tzi-cker Chiueh. An Implementation of a FIR Filter on a GPU. Techn. Ber., Stony Brook University, Experimental Computer Systems Lab, 2005.
- [172] Larry Seiler, Doug Carmean, Eric Sprangle, Tom Forsyth, Michael Abrash, Pradeep Dubey, Stephen Junkins, Adam Lake, Jeremy Sugerman, Robert Cavin, Roger Espasa, Ed Grochowski, Toni Juan und Pat Hanrahan. Larrabee: a many-core x86 architecture for visual computing. *ACM Transactions on Graphics*, Bd. 27 (3): S. 1–15, 2008.
- [173] Gilbert Strang und Truong Nguyen. *Wavelets and Filter Banks*. Wellesley-Cambridge Press, 1996.
- [174] Tapan K. Sarkar und C. Su. A Tutorial on Wavelets from an Electrical Engineering Perspective Part 2: The Continuous Case. *IEEE Antennas and Propagation Magazine*, Bd. 40 (6): S. 36–49, 1998.
- [175] Ingrid Daubechies. *Ten lectures on wavelets*. 61. CBMS-NSF regional conference series in applied mathematics. Society for Industrial and Applied Mathematics, 1992.

- [176] Olivier Rioul und Martin Vetterli. Wavelets and signal processing. *IEEE Signal Processing Magazine*, Bd. 8 (4): S. 14–38, 1991.
- [177] Claude E. Shannon. Communication in the Presence of Noise. *Proceedings of the IEEE*, Bd. 86: S. 447–457, 1998.
- [178] Martin Vetterli und Cormac Herley. Wavelets and Filter Banks: Theory and Design. *IEEE Transactions on Signal Processing*, Bd. 40 (9): S. 2207–2232, 1992.
- [179] Wim Sweldens. *The Construction and Application of Wavelets in Numerical Analysis*. Dissertation, Katholieke Universiteit Leuven, Belgien, 1995.
- [180] T.K. Sarkar, C. Su, R. Adve, M. Salazar-Palma, L. Garcia-Castillo und R.R. Boix. A Tutorial on Wavelets from an Electrical Engineering Perspective Part 1: Discrete Wavelet Techniques. *IEEE Antennas and Propagation Magazine*, Bd. 40 (5): S. 49–68, October 1998.
- [181] Gunnar Karlsson und Martin Vetterli. Extension of finite length signals for sub-band coding. *Signal Processing*, Bd. 17: S. 161–168, 1989.
- [182] Stephane G. Mallat. A theory for multiresolution signal decomposition: the wavelet representation. *IEEE Transactions on Pattern Analysis and Machine Intelligence*, Bd. 11 (7): S. 674–693, 1989.
- [183] Luca Citi, Jacopo Carpaneto, Ken Yoshida, Klaus-Peter Hoffmann, Klaus Peter Koch, Paolo Dario und Silvestro Micera. On the use of wavelet denoising and spike sorting techniques to process electroneurographic signals recorded using intraneural electrodes. *Journal of Neuroscience Methods*, Bd. 172: S. 294–302, 2008.
- [184] Iain M. Johnstone und Bernard W. Silverman. Wavelet threshold estimators for data with correlated noise. *Journal of the Royal Statistical Society B*, Bd. 59 (2): S. 319–351, 1997.
- [185] Raghuram Rangarajan, Ramji Venkataramanan und Siddarth Shah. Image Denoising Using Wavelets. Techn. Ber., University of Michigan, Department of Electrical Engineering and Computer Science, 2002.
- [186] Mehdi Nasri und Hossein Nezamabadi-pour. Image denoising in the wavelet domain using a new adaptive thresholding function. *Neurocomputing*, Bd. 72 (4–6): S. 1012–1025, 2009.
- [187] Xiao-Ping Zhang und Zhi-Quan Lou. A new time-scale adaptive denoising method based on wavelet shrinkage. In *IEEE International Conference on Acoustics, Speech, and Signal Processing (ICASSP)*, Bd. 3, S. 1629–1632. 1999.
- [188] Paul S. Addison. Wavelet transforms and the ECG: A review. *Physiological Measurement*, Bd. 26: S. R155–R199, 2005.

- [189] Shi Lihua, Chen Bin, Zhou Binhua und Gao Cheng. An adaptive wavelet denoising method for the measuring system of EMP signals. In *Conference on Environmental Electromagnetics*, S. 138–141. 2000.
- [190] Jacek Stepien und Tomasz P. Zielinski. Signal Denoising Using Line-Adaptive Lifting Wavelet Transform. In *Instrumentation and Measurement Technology Conference*, Bd. 2, S. 1386–1391. 2001.
- [191] Li Su und Guoliang Zhao. De-Noising of ECG Signal Using Translation-Invariant Wavelet De-Noising Method with Improved Thresholding. In *Proceedings of the 2005 IEEE Engineering in Medicine and Biology Conference*. 2005.
- [192] Mirosław Latka und Ziemowit Was. Wavelet analysis of epileptic spikes. *Physical Review E – Statistical, nonlinear, and soft matter physics*, Bd. 67: S. 052902–1–052902–4, 2003.
- [193] S. Poornachandra. Wavelet-based denoising using subband dependent threshold for ECG signals. *Digital Signal Processing*, Bd. 18 (1): S. 49–55, 2008.
- [194] Zhonghui Luo und Qijun Xiao. Study on Adaptive Wavelet De-Noising for Measurement Signals and Its Application. *Proceedings of the Sixth International Conference on Intelligent Systems Design and Applications (ISDA'06)*, Bd. 2: S. 789–793, 2006.
- [195] Lori Mann Bruce und Sara E. Larsen. Wavelet Denoising of Patch Clamp Signals for Improved Histogram Analysis. *Engineering in Medicine and Biology Society*, Bd. 1: S. 310–313, 2000.
- [196] Zhou Dengwen und Cheng Wengang. Image denoising with an optimal threshold and neighbouring window. *Pattern Recognition Letters*, Bd. 29: S. 1694–1697, 2008.
- [197] Brij N. Singh und Arvind K. Tiwari. Optimal selection of wavelet basis function applied to ECG signal denoising. *Digital Signal Processing*, Bd. 16: S. 275–287, 2006.
- [198] Jiecheng Xie, Dali Zhang und Wenli Xu. Spatially adaptive wavelet denoising using the minimum description length principle. *IEEE Transactions on Image Processing*, Bd. 13 (2): S. 179–187, 2004.
- [199] André Diedrich, Warakorn Charoensuk, Robert J. Brychta, Andrew C. Ertl und Richard Shiuvi. Analysis of raw microneurographic recordings based on wavelet de-noising technique and classification algorithm: wavelet analysis in microneurography. *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, Bd. 50 (1): S. 41–50, 2003.
- [200] Raul Benitez und Zoran Nenadic. Robust Unsupervised Detection of Action Potentials with Probabilistic Models. *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, Bd. 55 (4): S. 1344–1354, 2008.
- [201] Juan Carlos Letelier und Pamela P. Weber. Spike sorting based on discrete wavelet transform coefficients. *Journal of Neuroscience Methods*, Bd. 101 (2): S. 93, 2000.

- [202] Eyal Hulata, Ronen Segev, Yoash Shapira, Morris Benveniste und Eshel Ben-Jacob. Detection and sorting of neural spikes using wavelet packets. *Physical Review Letters*, Bd. 85 (21): S. 4637–4640, 2000.
- [203] Ernest Nlandu Kamavuako, Winnie Jensen, Ken Yoshida, Mathijs Kurstjens und Dario Farina. A criterion for signal-based selection of wavelets for denoising intrafascicular nerve recordings. *Journal of Neuroscience Methods*, Bd. 186 (2): S. 274–280, Februar 2010.
- [204] Matthew J. Nelson, Pierre Pouget, Erik A. Nilsen, Craig D. Patten und Jeffrey D. Schall. Review of signal distortion through metal microelectrode recording circuits and filters. *Journal of Neuroscience Methods*, Bd. 169: S. 141–157, 2008.
- [205] Kunal J. Paralikar, Chinmay R. Rao und Ryan S. Clement. New approaches to eliminating common-noise artifacts in recordings from intracortical microelectrode arrays: Inter-electrode correlation and virtual referencing. *Journal of Neuroscience Methods*, Bd. 181 (1): S. 27–35, June 2009.
- [206] Edward M. Schmidt. Computer separation of multi-unit neuroelectric data: a review. *Journal of Neuroscience Methods*, Bd. 12 (2): S. 95–111, 1984.
- [207] Enrique Soto, Elias Manjarrez und Rosario Vega. A microcomputer program for automated neuronal spike detection and analysis. *International Journal of Medical Informatics*, Bd. 44 (3): S. 203–212, 1997.
- [208] Jan H. Cocatre-Zilgien und Fred Delcomyn. A slope-based approach to spike discrimination in digitized data. *Journal of Neuroscience Methods*, Bd. 33 (2-3): S. 241, 1990.
- [209] Andreas Keuer. *Real Time Spike Detection Of Biological Neural Signals Using A FPGA Module*. Master thesis, University of Reading, 2004.
- [210] Rishi Chandra und Lance M. Optican. Detection, Classification, and Superposition Resolution of Action Potentials in Multiunit Single-Channel Recordings by an On-Line Real-Time Neural Network. *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, Bd. 44: S. 403–412, 1997.
- [211] Paul T. Watkins, Gopal Santhanam, Krishna V. Shenoy und Reid R. Harrison. Validation of Adaptive Threshold Spike Detector for Neural Recording. In *Proceedings of the 26th Annual International Conference of the IEEE EMBS*. 2004.
- [212] Nhamoinesu Mtetwa und Leslie S. Smith. Smoothing and thresholding in neuronal spike detection. *Neurocomputing*, Bd. 69 (10–12): S. 1366–1370, Juni 2006.
- [213] Hsiao-Lung Chan, Ming-An Lin, Tony Wu, Shih-Tseng Lee, Yu-Tai Tsai und Pei-Kuang Chao. Detection of neuronal spikes using an adaptive threshold based on the max-min spread sorting method. *Journal of Neuroscience Methods*, Bd. 172 (1): S. 112–121, 2008.

- [214] James F. Kaiser. On a simple algorithm to calculate the 'energy' of a signal. In *IEEE International Conference on Acoustics, Speech, and Signal Processing*, Bd. 1, S. 381–384, 1990.
- [215] Sudipta Mukhopadhyay und G.C. Ray. A New Interpretation of Nonlinear Energy Operator and Its Efficacy in Spike Detection. *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, Bd. 45 (2): S. 180–187, 1998.
- [216] Joon Hwan Choi und Taejeong Kim. Neural action potential detector using multi-resolution TEO. *IEE Electronics Letters*, Bd. 38 (12): S. 541–543, 2002.
- [217] Joon Hwan Choi, Hae Kyung Jung und Taejeong Kim. A New Action Potential Detector Using the MTEO and its Effects on Spike Sorting Systems at Low Signal-to-Noise Ratios. *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, Bd. 53 (4): S. 738–746, 2006.
- [218] Emmanuel C. Ifeachor und Barrie W. Jervis. *Digital Signal Processing - A Practical Approach*. Addison - Wesley, 2nd edition Aufl., 2002.
- [219] Zoran Nenadic und Joel W. Burdick. Spike Detection Using The Continuous Wavelet Transform. *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, Bd. 52 (1): S. 74–87, 2005.
- [220] Shihab A. Shamma und Xiaowei Yang. A Totally Automated Neural Spike Detection and Classification Scheme: A Preliminary Software System. Techn. Ber., University of Maryland, 1986.
- [221] Xiaowei Yang und Shihab A. Shamma. A totally automated system for the detection and classification of neural spikes. *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, Bd. 35 (10): S. 806–816, Oktober 1988.
- [222] George Zouridakis und David C. Tam. Multi-unit spike discrimination using wavelet transforms. *Computers in Biology and Medicine*, Bd. 27 (1): S. 9–18, 1997.
- [223] Kyung Hwan Kim und Sung June Kim. A Wavelet-Based Method for Action Potential Detection From Extracellular Neural Signal Recording With Low Signal-to-Noise Ratio. *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, Bd. 50 (8): S. 999–1011, 2003.
- [224] Dohoon Kim, Joon Hwan Choi und Taejeong Kim. A Wavelet(MZ-DWT) Based Action Potential Detector at Low Signal-to-Noise Ratios. In *The 2nd International IEEE Conference on Neural Engineering*, S. 301–303. IEEE, 2005.
- [225] Wilhelm Burger und Mark James Burge. *Digitale Bildverarbeitung*, Kap. Morphologische Filter, S. 169–194. Springer-Verlag, 2005.
- [226] Petros Maragos und Ronald W. Schafer. Morphological filters – Part I: Their set-theoretic analysis and relations to linear shift-invariant filters. *IEEE Transactions on Acoustics, Speech, and Signal Processing*, Bd. 35 (8): S. 1153–1169, August 1987.

- [227] Petros Maragos und Ronald W. Schafer. Morphological filters – Part II: Their relations to median, order-statistic, and stack filters. *IEEE Transactions on Acoustics, Speech, and Signal Processing*, Bd. 35 (8): S. 1170–1184, August 1987.
- [228] Lin-Sen Pon, Mingui Sun und Robert J. Sclabassi. The bi-directional spike detection in EEG using mathematical morphology and wavelet transform. In *6th International Conference on Signal Processing*, Bd. 2, S. 1512–1515. 2002.
- [229] Guanghua Xu, Jing Wang, Qing Zhang, Sicong Zhang und Junming Zhu. A spike detection method in EEG based on improved morphological filter. *Computers in Biology and Medicine*, Bd. 37: S. 1647–1652, 2007.
- [230] Emanuel E. Zelniker, Andrew P. Bradley, Joanna E. Castner, Helen J. Chenery, David A. Copland und Peter A. Silburn. Estimation of neuronal firing rates with the three-state biological point process model. *Journal of Neuroscience Methods*, Bd. 174 (2): S. 281–291, 2008.
- [231] Xinling Geng, Guangshu Hu und Xin Tian. Neural spike sorting using mathematical morphology, multiwavelets transform and hierarchical clustering. *Neuroc*, Bd. 73: S. 707–715, 2010.
- [232] Leslie S. Smith, S. Shahid, A. Vernier und Nhamoinesu Mtetwa. Finding events in noisy signals. In *The IET Irish Signals and Systems Conference*, S. 31–36. September 2007.
- [233] P. E. Trahanias. An Approach to QRS Complex Detection using Mathematical Morphology. *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, Bd. 40 (2): S. 201–205, Februar 1993.
- [234] M. Abeles und Jr. Goldstein, M.H. Multispikes train analysis. *Proceedings of the IEEE*, Bd. 65 (5): S. 762–773, May 1977.
- [235] A. Zviagintsev, Y. Perelman und R. Ginosar. A Low-Power Spike Detection and Alignment Algorithm. In *2nd International IEEE EMBS Conference on Neural Engineering*, S. 317 – 320. 2005.
- [236] Alex Zviagintsev, Yevgeny Perelman und Ran Ginosar. Algorithms and Architectures for Low Power Spike Detection and Alignment. *Journal of Neural Engineering*, Bd. 3: S. 35–42, 2006.
- [237] Satoshi Yamada, Hiroshi Kage, Michio Nakashima, Satoru Shiono und Mitsuo Maeda. Data processing for multi-channel optical recording: action potential detection by neural network. *Journal of Neuroscience Methods*, Bd. 43 (1): S. 23–33, 1992.
- [238] S Kim, J McNames und K. Burchiel. Action potential detection with automatic template matching. In *IEEE 26th Annual International Conference of the Engineering in Medicine and Biology Society, EMBC 2004*, Bd. 1, S. 41 – 44. 2004.
- [239] B.C. Wheeler und S.R. Smith. High-resolution alignment of action potential waveforms using cubic spline interpolation. *Journal of Biomedical Engineering*, Bd. 9: S. 47–53, 1987.

- [240] Scott R. Smith und Bruce C. Wheeler. A Real-Time Multiprocessor System for Acquisition of Multichannel Neural Data. *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, Bd. 35: S. 875–877, 1988.
- [241] Timothy J. Blanche und Nicholas V. Swindale. Nyquist interpolation improves neuron yield in multiunit recordings. *Journal of Neuroscience Methods*, Bd. 155: S. 81–91, 2006.
- [242] Pu-Ming Zhang, Jin-Yong Wu, Yi Zhou, Pei-Ji Liang und Jing-Qi Yuan. Spike sorting based on automatic template reconstruction with a partial solution to the overlapping problem. *Journal of Neuroscience Methods*, Bd. 135 (1-2): S. 55–65, 2004.
- [243] Joon Hwan Choi, Dohoon Kim und Taejeong Kim. A new overlapping resolution method for multi-channel spike sorting. In *The 2nd International IEEE EMBS Conference on Neural Engineering*, S. 683 – 686. IEEE, Washington D.C., USA, 2005.
- [244] C. Alippi und M. Roveri. Just-in-Time Adaptive Classifiers – Part I: Detecting Nonstationary Changes. *IEEE Transactions on Neural Networks*, Bd. 19 (7): S. 1145–1153, July 2008.
- [245] Cesare Alippi und Manuel Roveri. Just-in-Time Adaptive Classifiers – Part II: Designing the Classifier. *IEEE Transactions on Neural Networks*, Bd. 19 (12): S. 2053–2064, 2008.
- [246] Chih-Wei Chen, Chou-Ching K. Lin und Ming-Shaung Ju. Detecting movement-related EEG change by wavelet decomposition-based neural network trained with single thumb movement. *Clinical Neurophysiology*, Bd. 118: S. 802–814, 2007.
- [247] Isabelle Guyon und André Elisseeff. *Feature Extraction, Foundations and Applications*, Kap. An Introduction to Feature Extraction, S. 1–22. Springer, 2006.
- [248] Dimitros A. Adamos, Efstratios K. Kosmidis und George Theophilidis. Performance evaluation of PCA-based spike sorting algorithms. *Computer Methods and Programs in Biomedicine*, Bd. 91: S. 232–244, 2008.
- [249] György Buzsáki. Large-Scale Recording of Neuronal Ensembles. *Nature Neuroscience*, Bd. 7 (5): S. 446–451, 2004.
- [250] I. K. Fodor. A Survey of Dimension Reduction Techniques. Techn. Ber., U.S. Department of Energy, Lawrence Livermore National Laboratory, 2002.
- [251] P.M. Horton, A.U. Nicol, K.M. Kendrick und J.F. Feng. Spike sorting based upon machine learning algorithms (SOMA). *Journal of Neuroscience Methods*, Bd. 160: S. 52–68, 2007.
- [252] John K. Chapin und Miguel A. L. Nicolelis. Principal component analysis of neuronal ensemble activity reveals multidimensional somatosensory representations. *Journal of Neuroscience Methods*, Bd. 94 (1): S. 121–140, 1999.

- [253] E. Wood, M. Fellows, J.R. Donoghue und M.J. Black. Automatic spike sorting for neural decoding. In *26th Annual International Conference of the Engineering in Medicine and Biology Society, EMBC 2004*, Bd. 2, S. 4009 – 4012. 2004.
- [254] William H. Press, Saul A. Teukolsky, William T. Vetterling und Brian P. Flannery. *Numerical Recipes – The Art of Scientific Computing*. Cambridge University Press, 2007.
- [255] Stefan Pittner und Sagar V. Kamarthi. Feature Extraction From Wavelet Coefficients for Pattern Recognition Tasks. *IEEE Transactions on Pattern Analysis and Machine Intelligence*, Bd. 21 (1): S. 83–88, 1999.
- [256] Lei Wang. Feature Selection with Kernel Class Separability. *IEEE Transactions on Pattern Analysis and Machine Intelligence*, Bd. 30 (9): S. 1534–1546, 2008.
- [257] Seong S. Chae und William D. Warde. Effect on using principal coordinates and principal components on retrieval of clusters. *Computational Statistics & Data Analysis*, Bd. 50: S. 1407–1417, 2006.
- [258] Mark A. Kramer. Nonlinear Principal Component Analysis Using Autoassociative Neural Networks. *American Institute of Chemical Engineers Journal*, Bd. 37 (2): S. 233–243, 1991.
- [259] Mark Laubach, Marshall Shuler und Miguel A. L. Nicolelis. Independent component analyses for quantifying neuronal ensemble interactions. *Journal of Neuroscience Methods*, Bd. 94 (1): S. 141, 1999.
- [260] K. Kobayashi, I. Merlet und J. Gotman. Separation of spikes from background by independent component analysis with dipole modeling and comparison to intracranial recording. *Clinical Neurophysiology*, Bd. 112 (3): S. 405–413, 2001.
- [261] K. G. Oweiss und D. J. Anderson. Independent Component Analysis of Multichannel Neural Recordings at the Micro-Scale. In *Proceedings of the Second Joint EMBS/BMES Conference*. 2002.
- [262] Susumu Takahashi, Yoshio Sakurai, Minoru Tsukada und Yuichiro Anzai. Classification of neuronal activities from tetrode recordings using independent component analysis. *Neurocomputing*, Bd. 49 (1-4): S. 289–298, 2002.
- [263] Susumu Takahashi, Yuichiro Anzai und Yoshio Sakurai. A new approach to spike sorting for multi-neuronal activities recorded with a tetrode—how ICA can be practical. *Neuroscience Research*, Bd. 46 (3): S. 265–272, 2003.
- [264] S. Takahashi und Y. Sakurai. Real-time and automatic sorting of multi-neuronal activity for sub-millisecond interactions in vivo. *Neuroscience*, Bd. 134 (1): S. 301–315, 2005.

- [265] A. Ossadtchi, S. Baillet, J. C. Mosher, D. Thyerlei, W. Sutherling und R. M. Leahy. Automated interictal spike detection and source localization in magnetoencephalography using independent components analysis and spatio-temporal clustering. *Clinical Neurophysiology*, Bd. 115 (3): S. 508, 2004.
- [266] Amir Madany Mamlouk, Hannah Sharp, Kerstin Menne, Ulrich G. Hofman und Thomas Martinetz. Unsupervised spike sorting with ICA and its evaluation using GENESIS simulations. *Neurocomputing*, Bd. 65-66: S. 275–282, 2005.
- [267] Richard O. Duda, Peter E. Hart und David G. Stork. *Pattern Classification*. Wiley & Sons Inc., 2nd Aufl., 2001.
- [268] Rene F. Jansen und Andries Ter Maat. Automatic wave form classification of extracellular multineuron recordings. *Journal of Neuroscience Methods*, Bd. 42 (2): S. 123–132, 1992.
- [269] Hansang Cho, D. Corina, J.F. Brinkley, G.A. Ojemann und L.G. Shapiro. A New Template Matching Method using Variance Estimation for Spike Sorting. In *2nd International IEEE EMBS Conference on Neural Engineering*, S. 225 – 228. 2005.
- [270] Olga K. Chibirova, Tetyana I. Aksenova, Alim-Louis Benabid, Stephan Chabardes, Steeve Larouche, Jean Rouat und Alessandro E. P. Villa. Unsupervised Spike Sorting of extracellular electrophysiological recording in subthalamic nucleus of Parkinsonian patients. *Biosystems*, Bd. 79 (1-3): S. 159, 2005.
- [271] J. MacQueen. Some methods for classification and analysis of multivariate observations. In Lucien M. Le Cam und Jerzy Neyman (Herausgeber), *Proceedings of the Fifth Berkeley Symposium on Mathematical Statistics and Probability*, Bd. 1, S. 281–297. 1967.
- [272] Bruce C. Wheeler. Sorting action potentials one hundred channels at a time. In *14th Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society*, S. 2856–2857. 1992.
- [273] Eyal Hulata, Ronen Segev und Eshel Ben-Jacob. A method for spike sorting and detection based on wavelet packets and Shannon's mutual information. *Journal of Neuroscience Methods*, Bd. 117 (1): S. 1–12, 2002.
- [274] Z.S. Zumsteg, C. Kemere, S. O'Driscoll, G. Santhanam, R.E. Ahmed, K.V. Shenoy und T.H. Meng. Power feasibility of implantable digital spike sorting circuits for neural prosthetic systems. In *IEEE Transactions on Neural Systems and Rehabilitation Engineering*, Bd. 13, S. 272 – 279. 2005.
- [275] Gregory J. Dinning und Arthur C. Sanderson. Real-time classification of multiunit neural signals using reduced feature sets. *IEEE Transaction on Biomedical Engineering*, Bd. 28 (12): S. 804–812, 1981.

- [276] Daniel Fasulo. An Anlysis of Recent Work on Clustering Algorithms. Techn. Ber., Department of Computer Science and Engineering, University of Washington, 1999.
- [277] Jr Erwin B. Montgomery, He Huang und Amir Assadi. Unsupervised clustering algorithm for N-dimensional data. *Journal of Neuroscience Methods*, Bd. 144 (1): S. 19, 2005.
- [278] Greg Hamerly und Charles Elkan. Alternatives to the k-means algorithm that find better clusterings. In *Proceedings of the Eleventh International Conference on Information and Knowledge Management*, S. 600–607. 2002.
- [279] George Zouridakis und David C. Tam. Identification of reliable spike templates in multi-unit extracellular recordings using fuzzy clustering. *Computer Methods and Programs in Biomedicine*, Bd. 61 (2): S. 91–98, 2000.
- [280] Khashayar Mirfakhraei und Kenneth Horch. Classification of action potentials in multi-unit intrafascicular recordings using neural network pattern-recognition techniques. *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, Bd. 41 (1): S. 89–91, 1994.
- [281] Khashayar Mirfakhraei und Kenneth Horch. Tracking changes in action potential shapes in chronic multi-unit intrafascicular recordings using neural network pattern recognition techniques. *Engineering in Medicine and Biology Society, 1994. Engineering Advances: New Opportunities for Biomedical Engineers. Proceedings of the 16th Annual International Conference of the IEEE*, Bd. 2: S. 1095–1096, 1994.
- [282] Khashayar Mirfakhraei und Kenneth Horch. Recognition of temporally changing action potentials in multiunit neural recordings. *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, Bd. 44 (2): S. 123–131, 1997.
- [283] J.P. Stitt, R.P. Gaumont, J.L. Frazier und F.E. Hanson. A comparison of neural spike classification techniques. In *19th Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology society*, Bd. 3, S. 1092–1094. 1997.
- [284] J. P. Stitt, R. P. Gaumont, J. L. Frazier und F. E. Hanson. An Artificial Neuronal Network for Neural Spike Classification. In *Proceedings of the IEEE 23th Annual Northeast Bioengineering Conference*, S. 15–16. 1997.
- [285] J.P. Stitt. Action Potential Classifiers: A Functional Comparison of Template Matching, Principal Components Analysis, and an Artificial Neural Network. *Chemical Senses*, Bd. 23: S. 531–539, 1998.
- [286] R.J. Vogelstein, K. Murari, P.H. Thakur, C. Diehl, S. Chakrabartty und G. Cauwenberghs. Spike sorting with support vector machines. In *26th Annual International Conference of the Engineering in Medicine and Biology Society, EMBC 2004*, Bd. 1, S. 546 – 549. 2004.

- [287] Thomas Hermle, Cornelius Schwarz und Martin Bogdan. Employing ICA and SOM for spike sorting of multielectrode recordings from CNS. *Journal of Physiology-Paris*, Bd. 98 (4-6): S. 349–356, 2004.
- [288] Thomas Hermle, Martin Bogdan, Cornelius Schwarz und Wolfgang Rosenstiel. ANN-Based System for Sorting Spike Waveforms Employing Refractory Periods. In W. Duch (Herausgeber), *International Conference on Artificial Neural Networks 2005, LNCS 3696*, S. 121–126. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2005.
- [289] Marcelo Blatt, Shai Wiseman und Eytan Domany. Superparamagnetic Clustering of Data. *Physical Review Letters*, Bd. 76 (18): S. 3251–3254, 1996.
- [290] Marcelo Blatt, Shai Wiseman und Eytan Domany. Data Clustering Using a Model Granular Magnet. *Neural Computation*, Bd. 9 (8): S. 1805–1842, 1997.
- [291] F. Y. Wu. The Potts model. *Reviews of Modern Physics*, Bd. 54 (1): S. 235–268, Jan 1982.
- [292] Aharon Bar-Hillel, Adam Spiro und Eran Stark. Spike sorting: Bayesian clustering of non-stationary data. *Journal of Neuroscience Methods*, Bd. 157: S. 303–316, 2006.
- [293] V. C. Wilburn und W. E. Alexander. A Parallel Implementation of the Discrete Wavelet Transform. In *Proceedings of the 26th Southeastern Symposium on System Theory*, S. 260–264. 1994.
- [294] H. Sava, M. Fleury, A.C. Downton und A.F. Clark. Parallel pipeline implementation of wavelet transforms. *IEE Proceedings Vision, Image and Signal Processing*, Bd. 144: S. 355–360, 1997.
- [295] Manfred Feil, Rade Kutil und Andreas Uhl. *Lecture Notes in Computer Science*, Kap. Parallel Wavelet Transforms on Multiprocessors, S. 1013–1017. Springer, 1999.
- [296] Judith M. Ford, Ke Chen und Neville J. Ford. Parallel implementation of fast wavelet transforms. Techn. Ber., Manchester Centre for Computational Mathematics, University of Manchester, 2001.
- [297] Patricia González, José C. Cabaleiro und Tomás F. Pena. Parallel Computation of Wavelet Transforms using the Lifting Scheme. *The Journal of Supercomputing*, Bd. 18: S. 141–152, 2001.
- [298] D. Chaver, M. Prieto, L. Pinuel und F. Tirado. Parallel wavelet transform for large scale image processing. In *Parallel and Distributed Processing Symposium*, S. 4–9. 2002.
- [299] C. Tenllado, C. Garcia, M. Prieto, I. Pinuel und F. Tirado. Exploiting Multilevel Parallelism Within Modern Microprocessors: DWT as a Case Study. In *International Meeting on Vector and Parallel Processing (VECPAR '04)*, S. 556–568. 2004.
- [300] Kyoung-Su Oh und Keechul Jung. GPU implementation of neural networks. *Pattern Recognition*, Bd. 37: S. 1311–1314, 2004.

- [301] Darian Onchis und Constantin Marta. Multiple 1D data parallel wavelet transform. In *Proceedings of the Seventh International Symposium on Symbolic and Numeric Algorithms for Scientific Computation*. 2005.
- [302] Christian Tenllado, Javier Setoain, Manuel Prieto, Luis Pinuel und Francisco Tirado. Parallel Implementation of the 2D Discrete Wavelet Transform on Graphics Processing Units: Filter Bank versus Lifting. *IEEE Transactions on Parallel and Distributed Systems*, Bd. 19 (3): S. 299–310, 2008.
- [303] Joaquín Franco, Gregorio Bernabé, Juan Fernández und Manuel E. Acacio. A Parallel Implementation of the 2D Wavelet Transform Using CUDA. In *Conference on Parallel, Distributed and Network-based Processing*, S. 111–118. IEEE Computer Society, Los Alamitos, CA, USA, 2009.
- [304] Mircea Andrecut. Parallel GPU Implementation of Iterative PCA Algorithms. Techn. Ber., Institute for Biocomplexity and Informatics, University of Calgary, Canada, 2008.
- [305] Ren Wu, Bin Zhang und Meichun Hsu. Clustering billions of data points using GPUs. In *UCHPC-MAW'09: Proceedings of the combined workshops on UnConventional high performance computing workshop plus memory access workshop*, S. 1–6. ACM, New York, NY, USA, 2009.
- [306] Michael A. Gray. Getting started with GPU programming. *Computing in science & engineering*, Bd. 11: S. 61–64, 2009.
- [307] Mario Zechner und Michael Granitzer. Accelerating K-Means on the Graphics Processor via CUDA. In *First International Conference on Intensive Applications and Services*, S. 7–15. 2009.
- [308] Honghoon Jang, Anjin Park und Keechul Jung. Neural Network Implementation Using CUDA and OpenMP. *Digital Image Computing: Techniques and Applications*, Bd. n/a: S. 155–161, 2008.
- [309] Tim Bergel, Charlotte Gruner, Shane Guillory, Hans Loffler, Thane Plummer, Tony Reina, Casey Stengel, Kirk Korver, Harvey Wiggins und Willard Wilson. Neuroshare API Specification Rev. 1.3 - Application Programming Interface for Accessing Neurophysiology Experiment Data Files. Techn. Ber., NeuroShare Working Group, 2004.
- [310] Frank Gibson, Jim Austin, Colin Ingram, Martyn Fletcher, Tom Jackson, Mark Jessop, Alastair Knowles, Bojian Liang, Phillipp Lord, Georgios Pitsilis, Panayiotis Periorellis, Jennifer Simonotto, Paul Watson und Leslie Smith. The CARMEN virtual laboratory: Web-based paradigms for collaboration in neurophysiology. In *6th International Meeting on Substrate-Integrated Micro Electrode Arrays*, S. 117–120. 2008.

- [311] M. Wehr, J. S. Pezaris und M. Sahani. Simultaneous paired intracellular and tetrode recordings for evaluating the performance of spike sorting algorithms. *Neurocomputing*, Bd. 26-27: S. 1061–1068, 1999.
- [312] Romain Brette, Michelle Rudolph, Ted Carnevale, Michael Hines, David Beeman, James M. Bower, Markus Diesmann, Abigail Morrison, Philip H. Goodman, Frederick C. Harris Jr., Milind Zirpe, Thomas Natschläger, Dejan Pecevski, Bard Ermentrout Mikael Djurfeldt, Anders Lansner, Olivier Rochel, Thierry Vieville, Eilif Muller, Andrew P. Davison, Sami El Boustani und Alain Destexhe. Simulation of networks of spiking neurons: A review of tools and strategies. *Journal of Computational Neuroscience*, Bd. 23 (3): S. 349–398, Dezember 2007.
- [313] J. M. Bower und D. Beeman. *The Book of GENESIS: Exploring Realistic Neural Models with the GEneral NEural Simulation System*. Springer-Verlag, 1998.
- [314] M.L. Hines und N.T. Carnevale. NEURON: A Tool for Neuroscientists. *The Neuroscientist*, Bd. 7: S. 123–135, 2001.
- [315] Leslie S. Smith. Generating noise spike trains for testing spike detection and sorting algorithms. In *5th International Meeting on Substrate-Integrated Microelectrodes*, S. 79–80. 2006.
- [316] Leslie S. Smith und Nhamoinesu Mtetwa. A tool for synthesizing spike trains with realistic interference. *Journal of Neuroscience Methods*, Bd. 159 (1): S. 170–180, Januar 2007.
- [317] Ricardo Escolá, Christophe Pouzat, Antoine Chaffiol, Blaise Yvert, Isabelle E. Magning und Régis Guillemaud. SIMONE: A Realistic Neural Network Simulator to Reproduce MEA-based Recordings. *IEEE Transactions on Neural Systems and Rehabilitation Engineering*, Bd. 16 (2): S. 149–160, April 2008.
- [318] Joseph J. Pancrazio, Samuel A. Gray, Yura S. Shubin, Nadezhda Kulagina, David S. Cuttino, Kara M. Shaffer, Kevin Eisemann, Anthony Curran, Bret Zim, Guenter W. Gross und Thomas J. O’Shaughnessy. A portable microelectrode array recording system incorporating cultured neuronal networks for neurotoxin detection. *Biosensors and Bioelectronics*, Bd. 18: S. 1339–1347, 2003.
- [319] David B. Khatami, Yoonkey Nam und Bruce C. Wheeler. Tools for Automated Stimulation and Connectivity Analysis of Neuronal Networks Grown on Multielectrode Arrays. In *5th International Meeting on Substrate-Integrated Micro Electrode Arrays*, S. 224–225. 2006.
- [320] Ralph Meier, Ulrich Egert, Ad Aertsen und Martin P. Nawrot. FIND – A unified framework for neural data analysis. *Neural Networks*, Bd. 21 (8): S. 1085–1093, 2008.
- [321] Stephen H. Muggleton. Exceeding human limits. *Nature*, Bd. 440: S. 409–410, 2006.
- [322] Emery N. Brown, Robert E. Kass und Partha P. Mitra. Multiple neural spike train data analysis: state-of-the-art and future challenges. *Nature Neuroscience*, Bd. 7 (5): S. 456–461, 2004.

- [323] Eugene M. Izhikevich. Simple Model of Spiking Neurons. *IEEE Transactions on Neural Networks*, Bd. 14: S. 1569–1572, 2003.
- [324] Leslie S. Smith und Nhamoinesu Mtetwa. Manual for the Noisy Spike Generator MATLAB Software: Version 1.1. Techn. Ber., University of Sterling, Department of Computing Science and Mathematics, 2006.
- [325] David L. Donoho. Wavelet Shrinkage and W.V.D.: A 10-minute Tour. In *Progress in Wavelet Analysis and Applications*, S. 109–128. 1993.
- [326] David L. Donoho und Iain M. Johnstone. Ideal Spatial Adaptation by Wavelet Shrinkage. *Biometrika*, Bd. 81: S. 425–455, 1994.
- [327] David L. Donoho und Iain M. Johnstone. Adapting to Unknown Smoothness via Wavelet Shrinkage. *Journal of the American Statistical Association*, Bd. 90 (432): S. 1200–1224, 1995.
- [328] Sebastian E. Ferrando und Randall Pyke. Ideal denoising for signals in sub-Gaussian noise. *Applied and Computational Harmonic Analysis*, Bd. 24: S. 1–13, 2008.
- [329] Sebastian E. Ferrando und L. A. Kolasa. Averages of best wavelet basis estimates for denoising. *Journal of Computational and Applied Mathematics*, Bd. 136 (1–2): S. 357–367, 2001.
- [330] Herjan J. Barnard, Jos H. Weber und Jan Biemond. Efficient signal extension for subband/wavelet decomposition of arbitrary-length signals. In Barry G. Haskell und Hsueh-Ming Hang (Herausgeber), *Visual Communications and Image Processing '93*, Bd. 2094, S. 966–975. 1993.
- [331] John R. Williams und Kevin Amaratunga. A Discrete Wavelet Transform without edge effects using wavelet extrapolation. *Journal of Fourier Analysis and Applications*, Bd. 3 (4): S. 435–449, 1997.
- [332] Sumit K. Nath und Eric Dubois. Minimization of edge effects in images using an extrapolated discrete wavelet transform. In M. R. Azimi-Sadjadi & S. Sheedvash (Herausgeber), *Society of Photo-Optical Instrumentation Engineers (SPIE) Conference Series*, Bd. 4520 von *Presented at the Society of Photo-Optical Instrumentation Engineers (SPIE) Conference*, S. 1–12. 2001.
- [333] Konstantinos I. Diamantaras und S. Y. Kung. *Principal Component Neural Networks – Theory and Applications*. John Wiley & Sons. Inc, 1996.
- [334] Mao Ye, Zhang Yi und Jian Cheng Lv. A globally convergent learning algorithm for PCA neural networks. *Neural Computation & Applications*, Bd. 14: S. 18–24, 2005.
- [335] Geoffrey E. Hinton und Ruslan R. Salakhutdinov. Reducing the Dimensionality of Data with Neural Networks. *Science*, Bd. 313: S. 504–507, 2006.
- [336] Pierre F. Baldi und Kurt Hornik. Learning in Linear Neural Networks: A Survey. *IEEE Transactions on Neural Networks*, Bd. 6 (4): S. 837–858, 1995.

- [337] Simon S. Haykin. *Neural networks - A comprehensive foundation*. Prentice Hall, 2. auflage Aufl., 1999.
- [338] Terence D. Sanger. Optimal unsupervised learning in a single-layer linear feedforward neural network. *Neural Networks*, Bd. 2 (6): S. 459–473, 1989.
- [339] Dan Pelleg und Andrew Moore. X-means: Extending k-means with efficient estimation of the number of clusters. In *Proceedings of the Seventeenth International Conference on Machine Learning*, S. 727–734. Morgan Kaufmann, San Francisco, 2000.
- [340] René Schrott. *Integration eines Neuro-Sensors in ein Messsystem sowie Untersuchungen zur Unit-Separation*. Dissertation, Institut für Gerätesysteme und Schaltungstechnik, Universität Rostock, 2008.
- [341] A. Cohen, I. Daubechies, B. Jawerth und P. Vial. Multiresolution analysis, wavelets and fast algorithms on an interval. *CRAS Paris*, Bd. 316: S. 471–421, 1993.
- [342] Andreas Zell. *Simulation neuronaler Netze*. Oldenbourg Verlag, 2000.
- [343] Werner Baumann, Mirko Lehmann, A Schwinde, Ralf Ehret, Martin Brischwein und Bernard Wolf. Microelectronic sensor system for microphysiological application on living cells. *Sensors and Actuators B*, Bd. 55: S. 77–89, 1999.
- [344] Werner Baumann, Erik Schreiber, Guido Krause, Simone Stüwe, Angela Podssun, Susanne Homma, Holger Anlauf, Ronny Rosner, Ingo Freund und Mirko Lehmann. Multiparametric neurosensor microchip. In *Euroensors XVI*, S. 1169–1172. 2002.
- [345] Werner Baumann, Erik Schreiber, Guido Krause, Angela Podssun, Susanne Homma, Andreas Keuer, Erik Schreiber, Ingo Freund und Mirko Lehmann. Living Neuronal Networks on Multiparametric Neurosensor Microchips. In *11. Symposium Maritime Elektrotechnik, Elektronik und Informationstechnik, Arbeitskreis Mess- und Informationstechnik*. 2004.
- [346] Werner Baumann, Erik Schreiber, Guido Krause, Angela Podssun, Susanne Homma, René Schrott, Ralf Ehret, Ingo Freund und Mirko Lehmann. Cell Monitoring System with Multiparametric CMOS Sensorchips. In *Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences, μ -TAS*, S. 554–556. 2004.
- [347] Werner Baumann, Erik Schreiber, Guido Krause, Angela Podssun, Susanne Homma, René Schrott, Ralf Ehret, Ingo Freund und Mirko Lehmann. Multiparametric Microchips. In *4th International Meeting on Substrate - Integrated Mirco Electrode Arrays, SIMEA 2004*, S. 21. 2004.
- [348] Werner Baumann, Erik Schreiber, Guido Krause, Angela Podssun, Susanne Homma, René Schrott, Helmut Beikirch, Ralf Ehret, Andreas Keuer, Ingo Freund und Mirko Lehmann. Zell Monitoring System mit multiparametrischen CMOS Halbleiter Mikrosensorchips. In *Mikrosystemtechnik Kongress 2005*, S. 345 – 348. VDE Verlag, Freiburg, 2005.

- [349] Werner Baumann, Erik Schreiber, Guido Krause, Angela Podssun, Susanne Homma, René Schrott, Helmut Beikirch, Ralf Ehret, Andreas Keuer, Ingo Freund und Lehmann Mirko. Zell Monitoring System mit multiparametrischen CMOS Biosensorchips. In Gerald Gerlach und Heiner Kaden (Herausgeber), *7. Dresdner Sensor-Symposium - Neue Herausforderungen und Anwendungen in der Sensortechnik*, S. 95–98. TUDpress, 2005.
- [350] Ralf Ehret, Olaf Schröder, Dieter G. Weiss und Werner H. Baumann. NeuroSensorix - High-Content Screening for the Development of Neuro-Pharmaceuticals. Produktbroschüre, 2005.
- [351] Guido Krause, Stefanie Lehmann, Mirko Lehmann, Ingo Freund, Erik Schreiber und Werner Baumann. Measurement of electrical activity of long-term mammalian neuronal networks on semiconductor neurosensor chips and comparison with conventional microelectrode arrays. *Biosensors and Bioelectronics*, Bd. 21 (7): S. 1272–1282, 2006.
- [352] Carsten Tautorat. *Entwurf und Realisierung einer Testumgebung für einen neuronalen Silizium-Hybrid-Netzwerksensor*. Diplomarbeit, Universität Rostock, 2005.
- [353] René Schrott. Dokumentation des neuronalen Silizium-Hybrid-Netzwerksensor BISC. Techn. Ber., Universität Rostock, Institut für Gerätesysteme und Schaltungstechnik, März 2003. Interne Dokumentation.
- [354] Sebastian Schundau. *Entwurf einer Systemumgebung zur elektrischen Beeinflussung neurobiologischer Signalmuster von Zellen*. Diplomarbeit, Universität Rostock, April 2006.
- [355] Volker Bucher, Michael Graf, Martin Stelzle und Wilfried Nisch. Low-impedance thin-film polycrystalline silicon microelectrodes for extracellular stimulation and recording. *Biosensors and Bioelectronics*, Bd. 14: S. 639–649, 1999.
- [356] Bernd Fritzke. Unsupervised clustering with growing cell structures. In *Seattle International Joint Conference on Neural Networks (IJCNN-91)*, Bd. 2, S. 531–536. IEEE, 1991.
- [357] Bernd Fritzke. Growing Cell Structures – A self-organizing network for unsupervised and supervised learning. *Neural Networks*, Bd. 7 (9): S. 1441–1460, 1994.
- [358] Bernd Fritzke. A growing neural gas network learns topologies. In G. Tesauro, D. S. Touretzky und T. K. Leen (Herausgeber), *Advances in Neural Information Processing Systems 7*, S. 625–632. MIT Press, Cambridge MA, 1995.
- [359] A. David Redish. MClust – Spike sorting toolbox. Documentation for MClust version 3.3. Techn. Ber., University of Minnesoty, Minneapolis, 2003.
- [360] Lynn Hazan, Michael Zugaro und György Buzsáki. Klusters, NeuroScope, NDManager: A free software suite for neurophysiological data processing and visualization. *Journal of Neuroscience Methods*, Bd. 155: S. 207–216, 2006.

- [361] Matthieu Delescluse und Christophe Pouzat. Efficient spike-sorting of multi-state neurons using inter-spike intervals information. *Journal of Neuroscience Methods*, Bd. 150 (1): S. 16–29, 2006.
- [362] Ueli Rutishauser, Erin M. Schuman und Adam N. Mamelak. Online detection and sorting of extracellularly recording action potentials in human medial temporal lobe recordings, in vivo. *Journal of Neuroscience Methods*, Bd. 154: S. 204–224, 2006.
- [363] D. A. Wagenaar, T. B. DeMarse, und S. M. Potter. MEABench: A Toolset for Multi-electrode Data Acquisition and On-line Analysis. In *2nd International IEEE EMBS Conference on Neural Engineering*, S. 518–521. 2005.
- [364] Alfred Stett. Microchips and Microelectrodes: Innovations for Basic Research, Neurotechnology and Drug Discovery. In *4th International Meeting on Substrate-Integrated Microelectrode Arrays*, S. 14. 2004.
- [365] Partha Mitra und Hemant Bokil. *Observed Brain Dynamics*. Oxford University Press, New York, 2008.
- [366] Michale S. Fee, Partha P. Mitra und David Kleinfeld. Automatic sorting of multiple unit neuronal signals in the presence of anisotropic and non-Gaussian variability. *Journal of Neuroscience Methods*, Bd. 69: S. 175–188, 1996.
- [367] Malcolm Lidiierth. sigTOOL: A MATLAB-based environment for sharing laboratory-developed software to analyze biological signals. *Journal of Neuroscience Methods*, Bd. 178 (1): S. 188–196, 2009.
- [368] Aapo Hyvärinen, Juha Karhunen und Erkki Oja. *Independent Component Analysis*. John Wiley & Sons, 2001.
- [369] Andreas V. M. Herz, Tim Gollisch, Christian K. Machens und Dieter Jaeger. Modeling Single-Neuron Dynamics and Computations: A Balance of Detail and Abstraction. *Science*, Bd. 314: S. 80–85, 2006.
- [370] Andreas V. M. Herz, Ralph Meier, Martin P. Nawrot, Willi Schiegel und Tiziano Zito. G-Node: An integrated tool-sharing platform to support cellular and systems neurophysiology in the age of global neuroinformatics. *Neural Networks*, Bd. 21: S. 1070–1075, 2008.
- [371] Martyn Fletcher, Bojian Liang, Leslie Smith, Alastair Knowles, Tom Jackson, Mark Jessop und Jim Austin. Neural network based pattern matching and spike detection tools and services in the CARMEN neuroinformatics project. *Neural Networks*, Bd. 21: S. 1076–1084, 2008.
- [372] Shahjahan Shahid und Leslie S. Smith. Assessing new techniques for spike detection on MEA data. In *6th International Meeting on Substrate-Integrated Micro Electrode Arrays*, S. 133–134. 2008.

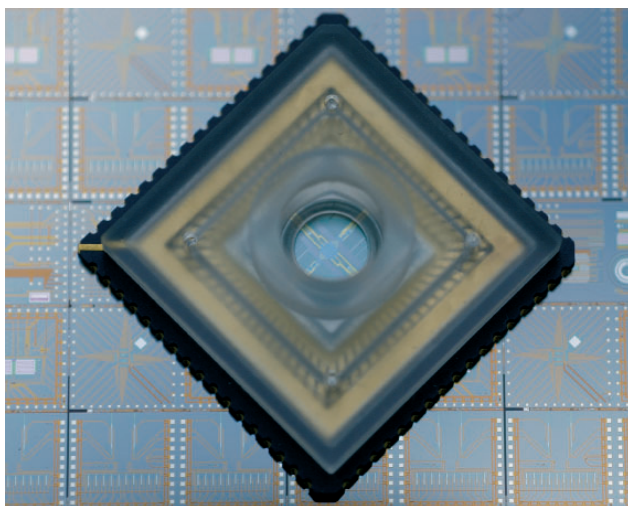
A Cell Monitoring System

In Zusammenarbeit mit der Micronas GmbH (Freiburg), dem Institut für Biowissenschaften (Abteilung Biophysik) und dem Institut Gerätesysteme und Schaltungstechnik der Universität Rostock wurde im Landesforschungsschwerpunkt „Neuronaler Silizium-Hybrid-Netzwerksensor zum Monitoring neuronaler Aktivitätszustände und Substanzwirkungen“ ein Neurochip entwickelt, mit dem die kontinuierliche Aufnahme und Auswertung von elektrophysiologischen und stoffwechselbedingten Parametern möglich ist [343–349].

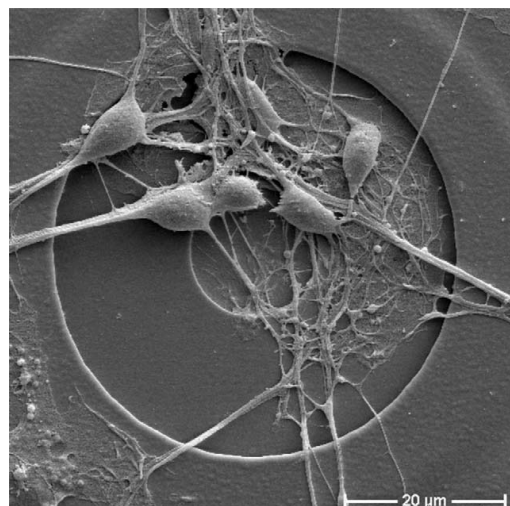
Die entwickelten Verfahren zur automatischen Signalverarbeitung sollen in diesem System Anwendung finden, können aber durch ihre Flexibilität auch in anderen Systemen verwendet werden. Das für die Untersuchungen verwendete MEA-System soll nachfolgend vorgestellt werden.

A.1 Eigenschaften des Multielektroden-Arrays

Das von den oben genannten Partnern entwickelte MEA-Konzept besteht neben einem siliziumbasierten MEA (siehe Abbildung A.1) aus zusätzlichen analogen und digitalen Komponenten, die die abgeleiteten Signale analog vorverarbeiten, digitalisieren, auf einem FPGA verarbeiten und zur grafischen Auswertung bzw. Speicherung an einen PC weiterreichen.



(a) Neurochip BISC02



(b) Neuronen auf Palladium-Elektrode

Abbildung A.1 NeuroChip (a) und REM-Aufnahme (b) einer passiven Palladium-Elektrode mit kultivierten Zellen nach drei Tagen [350, 351].

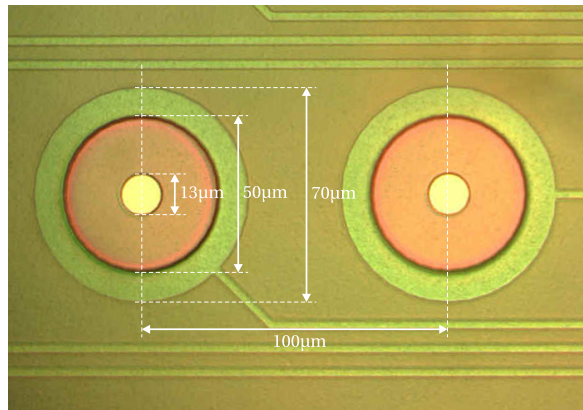


Abbildung A.2 Abmessung der Elektroden des BISC02

Das verwendete Multielektroden-Array wurde in Silizium gefertigt. Neben unterschiedlichen Sensoren konnten bereits zusätzliche analoge Komponenten zur sensornahen Signalaufbereitung und -verstärkung in den Chip integriert werden. Der auf CMOS-Basis gefertigte Sensorchip verfügt über folgende Eigenschaften [48, 352, 353]:

- Sensormatrix bestehend aus insgesamt 68 Palladium-Elektroden (vgl. auch Abbildung A.2) zur Messung von Aktionspotenzialen. Die Signale aus 64 Elektroden können über die integrierten analogen Komponenten verstärkt werden können, die restlichen 4 Elektroden sind direkt nutzbar;
- 2 ionensensitive Feldeffekttransistoren (ISFET) zur pH-Wert-Messung;
- 14 Cell Potential Feldeffekttransistoren (CPFETs) zur alternativen Messung von Aktionspotenzialen;
- Integrierte Verstärker, Filter und Multiplexer;
- Konfiguration der integrierten Baugruppen über I²C;
- Möglichkeit zur Stimulation von Zellen (genauere Informationen in [354]).

Der Durchmesser der Elektroden beträgt 13 μm . Dadurch kann es vorkommen, dass von einer Elektrode bis zu vier Signale von umliegenden Neuronen gleichzeitig abgeleitet werden. Für eine optimale Zellsignalanalyse ist es aber wichtig, die Einzelsignale den richtigen Neuronen zuzuordnen, um die individuelle Spikeaktivität zu messen.

Auf Basis des MEAs sollte ein Gesamtkonzept aus Hard- und Software entwickelt werden, das folgende Anforderungen enthält:

- Hardware:
 - einfache Konfiguration der Chips;
 - automatische Kalibrierung der Elektroden;
 - simultane Signalakquise von 64 Elektroden;
 - Vorverarbeitung (Filterung, Verstärkung) aller Elektrodensignale;
 - Digitalisierung der Signale;

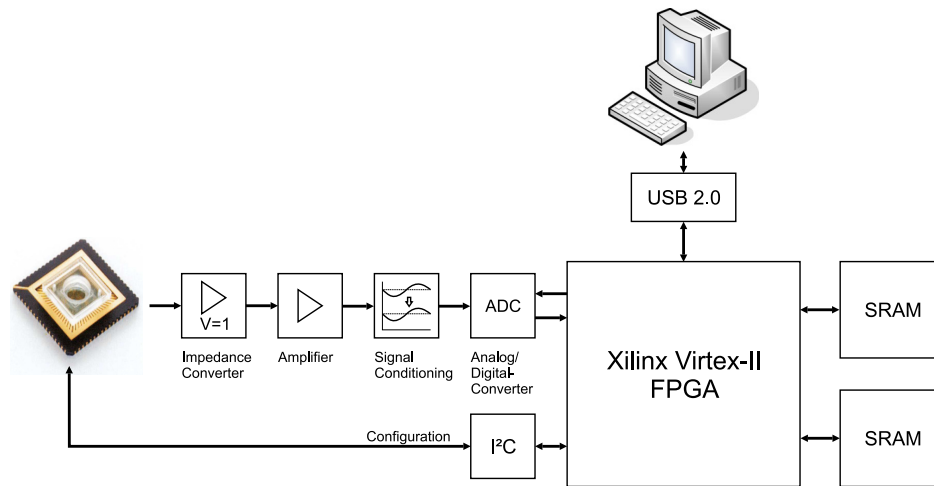


Abbildung A.3 Darstellung des Gesamtsystems aus BISC-Chip und Neuromessadapter.

- Konfiguration und Übertragung der Messdaten an einen PC;
- Software:
 - einfach zu bedienende grafische Benutzeroberfläche zur Ansteuerung und Signalauswertung
 - automatisierte Auswertung der abgeleiteten Signale

Aus den genannten Anforderungen an die zusätzliche Hardware wurde ein Neuromessadapter (vgl. Abbildung A.3) entwickelt, der nachfolgende Aufgaben realisiert:

- Aufbereitung der Elektrodensignale für die Digitalisierung (Filterung, Verstärkung, Pegelanpassung, A/D-Wandlung);
- Hardwarekomponenten zur Stimulation von Zellen über Elektroden;
- Analoger Testbus zum Testen der Einzelkomponenten;
- Auswertung des pH-Wertes (Ansteuerung/Auswertung ISFETs)
- Temperaturmessung;
- Komponenten zur stabilen Spannungsversorgung;
- Schnittstellen zur Anbindung an einen DSP und FPGA;
- Kommunikation mit einem PC über USB 2.0.

Als zentrales Steuerelement wurde auf dem Neuromessadapter ein *Field Programmable Gate Array* (Xilinx Virtex-II) eingesetzt. Dieser dient zum einen zur Ansteuerung der 12 Analog/Digital-Wandler, die sowohl für die Signalakquise als auch für die Kalibrierung verwendet werden. Zum anderen wurden 3 Digital/Analog-Wandler eingesetzt, um analoge Signale zur Zellstimulation zu generieren. Hierfür können im FPGA gespeicherte Muster abgerufen und an einen beliebigen Sensor weitergeleitet werden. Weitere Aufgaben des FPGA bestehen in der Konfiguration der auf dem MEA befindlichen Baugruppen mittels I²C sowie der Ansteuerung von Multiplexern sowie eines USB-Moduls zur Kommunikation mit einem PC. Ein FPGA erwies sich für die hier anfallenden Aufgaben als optimal.

Die noch zur Verfügung stehenden Ressourcen des FPGA wurden dazu genutzt, um eine hardware-optimierte Filterung mittels Wavelets für alle Kanäle zu realisieren.

Die Einzelkomponenten aus MEA, Neuromessadapter sowie einem Mikropumpen- und Heizungssystem wurden in einem Gesamtsystem als sog. *Cell Monitoring System* (CMS) integriert. Damit sind Aufzeichnungen von elektrophysiologischen Aktivitäten aus Zellnetzwerken möglich. Die speziell für das System entworfene analoge Signalkonditionierung sorgt für eine optimale rausch- und offsetarme Filterung, Verstärkung und Signalanpassung. Der auf dem System integrierte FPGA übernimmt die gesamte Ansteuerung der Einzelkomponenten, einen Teil der Signalverarbeitung und die Kommunikation mit einem angeschlossenen PC.

Herkömmliche MEAs bestehen aus Glas mit aufgetragenen Elektroden aus Gold oder anderen Materialien. Diese Systeme besitzen relativ große Kulturvolumina und benötigen deshalb auch eine entsprechend hohe Anzahl von Zellen und große Proben bei Substanzzugaben. Auf einem Glas-MEA lassen sich zudem nur Sensoren zur Ableitung elektrischer Signale aufbringen. Dem gegenüber können bei CMOS-basierten MEAs kleinere Kammervolumina realisiert werden, so dass weniger Zellkulturen und Substanzzugaben notwendig sind. Die CMOS-Technologie ermöglicht zudem eine hohe Reproduzierbarkeit und die Integration mehrerer unterschiedlicher Sensortypen auf einem MEA (bspw. CPFETs, ISFETs, Sauerstoffsensoren, Osmolaritätssensoren und Temperaturdioden). Der große Vorteil besteht neben einer größeren Miniaturisierung außerdem in der Möglichkeit, analoge und digitale Schaltungskomponenten direkt im Chip zu integrieren. Durch kürzere Signalwege wird ein besseres Signalrauschverhältnis erzielt [48]. Auch die Integration von besseren Stimulationsmethoden ist mit dieser Technologie möglich. Weitere Informationen dazu können [73–80, 355] entnommen werden.

Um eine möglichst detailreiche Aufzeichnung der abgeleiteten Signale zu gewährleisten, wurden die Analog/Digital-Wandler für zwei auswählbare Abtastraten von 20 kHz und 33 kHz pro Sensor dimensioniert. Um die gesamte Dynamik der Aktionspotenziale erfassen zu können, ist eine relativ hohe Auflösung der abgetasteten Signale erforderlich. Technisch realisiert wurden 14bit. Bei 64 Sensoren entsteht dabei ein kontinuierlicher Datenstrom mit einer Bandbreite von ca. 3,5 MB. Der FPGA unterstützt zwei Betriebsmodi. Im ersten Modus werden die ungefilterten Daten mittels Wavelet-Transformation gefiltert und als kontinuierlicher Datenstrom an den PC weitergeleitet. Um den Datenstrom zu reduzieren, wurde im FPGA zusätzlich eine automatische Erkennung von Aktionspotenzialen implementiert. Abhängig von der Spikerate reduziert sich der Datenstrom dabei um ein Vielfaches, da nur noch die extrahierten Spikes mit notwendigen Parametern (Zeitstempel, Triggerschwelle, Rauschwerte) zur weiteren Verarbeitung an den PC übertragen werden. Die so freiwerdenden Ressourcen im PC können dann für andere Aufgaben genutzt werden. Bei der aktuellen Implementierung wird im FPGA lediglich mit einer Auflösung von 12 bit gearbeitet. Zudem sind keine Fließkommaoperationen möglich, so dass bei der Verwendung dieses Modus ein Teil der Auflösung verloren geht. Um die digitalisierten Daten in ihrer vollen Auflösung zu verarbeiten und trotzdem Ressourcen im PC zu reduzieren, wurde im Neuromessadapter bereits eine Schnitt-

stelle für eine Anbindung eines DSPs vorgesehen. Weitere Einzelheiten zu den Betriebsarten und Konfigurationsmöglichkeiten des BISC sind [353] zu entnehmen. Informationen zu den analogen und digitalen Baugruppen und deren Ansteuerung mittels Neuromessadapter sind in [352] zu finden.

A.2 Software zur Ansteuerung und Signalauswertung

Für den Entwurf und den Test von Algorithmen wurde MATLAB verwendet. Um die Performance der Signalverarbeitung weiter zu erhöhen und um die entwickelte Hardware einfacher bedienen zu können, wurde eine Software zur Ansteuerung und Auswertung in C/C++ geschrieben. Dieser Abschnitt stellt den groben Entwurf der Software vor.

In Abbildung A.4 sind die einzelnen Klassen und deren Funktion dargestellt. Zusätzlich wurden neue Schnittstellen zwischen den einzelnen Klassen geschaffen, um die unterschiedlichen Datenströme optimal zu verwalten.

Die Klasse `CDataReader` dient dem Einlesen von Daten unabhängig von der Datenquelle. Einerseits können gespeicherte Daten im Plexon-Format eingelesen werden oder direkt via USB. Der einzige Unterschied besteht in der Funktion, die die jeweilige Datenquelle öffnet. Die Weiterverarbeitung ist bei beiden Verfahren identisch. Hierbei ist auch denkbar, die NeuroShare-Bibliothek [309] einzubinden, so dass weitere Datenformate gelesen werden können.

Die Klasse `CDataReader` dient dem Einlesen von unverarbeiteten Daten aus unterschiedlichen Quellen. Diese können als Datei vorliegen oder auch direkt von einem USB-Stream geliefert werden. Mit dieser Klasse soll ein einheitliches Datenhandling realisiert werden, so dass in eigenen Programmen die Datenquelle schnell und einfach austauschbar ist.

Unterschiedliche Konstruktoren der Klasse `CDataReader` ermöglichen das Öffnen von unterschiedlichen Datenquellen. Bei Dateien wird anhand der Endung die jeweilige Dateistruktur ermittelt. Ist eine Dateiendung unbekannt, wird ein Fehler ausgegeben.

```
CDataReader dataReader(char *filename);
```

Um Daten direkt von einer USB-Schnittstelle zu empfangen, wurde die Funktion `openUSB()` implementiert. Mit dieser Funktion wird die Schnittstelle initialisiert und der interne Zeiger auf die Funktionen zur Datenausgabe gelegt. Dadurch wird zwar eine andere Datenquelle gewählt, das weitere Vorgehen beim Empfangen von Daten über USB ist aber identisch zu Dateien.

Im nachfolgenden Beispiel wird die Datei `testdaten.ddt` im DDT-Format geöffnet und die Samples von Kanal 0 jeweils in 128er-Blöcken ausgelesen. Mit der Funktion `doSomething()` können die im Array `pData` enthaltenen Werte bearbeitet werden.

```

long size, offset = 0;
short *pData, frameSize;

// Datei öffnen
CDataReader dataReader("testdaten.ddt");

// Ermitteln der Anzahl der in der Datei vorhandenen Werte pro Kanal
size = dataReader.SamplesPerChannel;

// Anzahl der pro Block abzuholenden Werte
frameSize = 128;

// Werte auslesen
while (size > 0) {

// getSampleFrame() holt <frameSize> Werte ab der Position <offset> von Kanal 0.
// Die Funktion gibt einen Zeiger auf ein Array mit <frameSize> Werten zurück.
pData = dataReader.getSampleFrame(0, offset, frameSize);

// Hier können nun eigene Verarbeitungsschritte eingefügt werden
doSomething(pData, frameSize);

// Gesamtanzahl an Werten um <frameSize> reduzieren
size -= frameSize;

// Offset für nächsten Durchlauf um <frameSize> erhöhen
offset += frameSize;

// Wenn verbleibende Anzahl an Werten in der Datei kleiner ist als
// <frameSize>, dann sollen nur noch die verbleibenden Werte geholt werden
if (size < frameSize) frameSize = size;
}

```

Die weiteren Klassen dienen der Vorverarbeitung, dem Clustering und der Darstellung der analysierten Signale. In der Klasse `CDataPreprocessing` können ungefilterte Daten aufbereitet und Aktionspotenziale extrahiert werden. Verwendet man vorsortierte Dateien, bei denen die Aktionspotenziale bereits extrahiert wurden, können die Daten direkt mit der Klasse `CFeatureExtraction` weiterverarbeitet werden. In dieser Klasse ist die neuronale Hauptkomponentenanalyse (PCA) implementiert. Die berechneten Eigenschaften lassen sich einerseits mittel `COpenGLControl` direkt anzeigen oder mit `CDataClustering` vorher clustern. Als Clusterverfahren wurde bisher in C/C++ nur das wachsende neuronale Gas nach [356–358] implementiert, da dies neben k -means als weiteres vielversprechendes Verfahren untersucht worden ist. Letztendlich können die geclusterten Daten mittels `CDataClassification` klassifiziert, also einer *Unit* zugeordnet werden und in verschiedenen Datenformaten mit `CDataWriter` gespeichert werden. Die beschriebenen Klassen sind als *work in progress* anzusehen und benötigen für eine optimale Signalauswertung weitere Arbeitsschritte.

Um die Sensorchips einfach zu konfigurieren, aber auch erste Untersuchungen durchführen zu

Schnittstellen zwischen den einzelnen Klassen

Diese Strukturen (structs) sind in der Datei MDInterfaces.h definiert und dienen dem Datenaustausch zwischen den einzelnen Klassen.

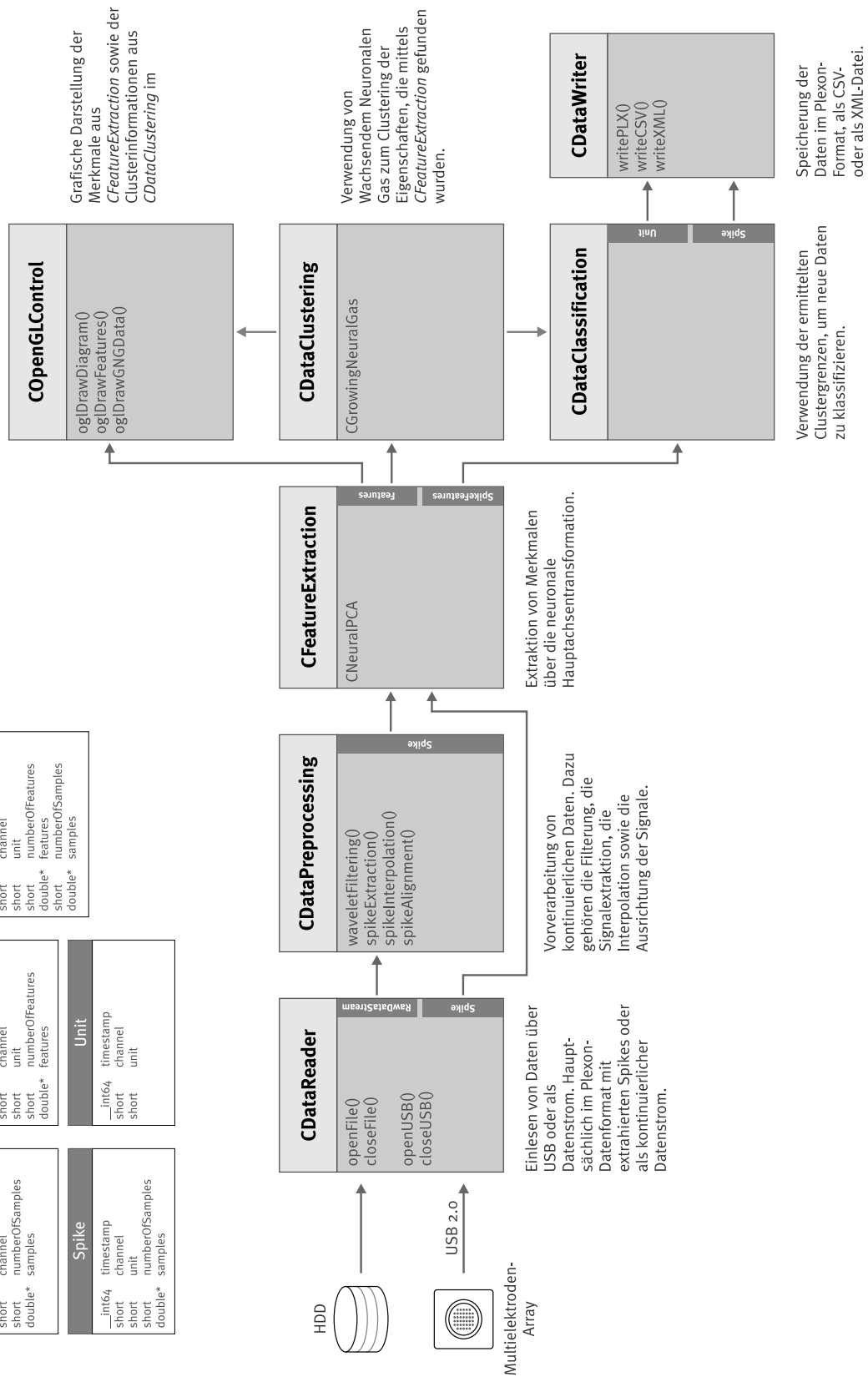
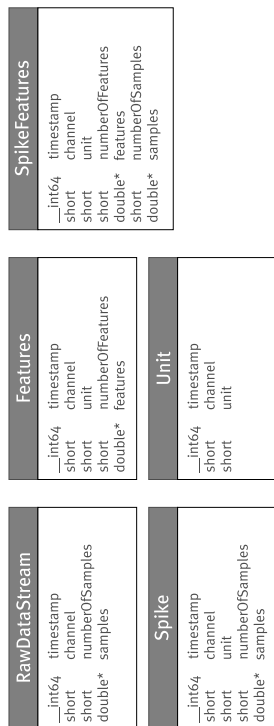


Abbildung A.4 Softwarekonzept

können, wurden verschiedene Programme entwickelt. Das Programm *BISC Recorder* (Abbildung A.5) wurde für umfangreiche Tests der einzelnen Baugruppen entworfen und genutzt. Erste Erkenntnisse aus der Nutzung der Software wurden dann in einer weiteren Software zur effizienten Bedienung des *Cell Monitoring Systems* verwendet.

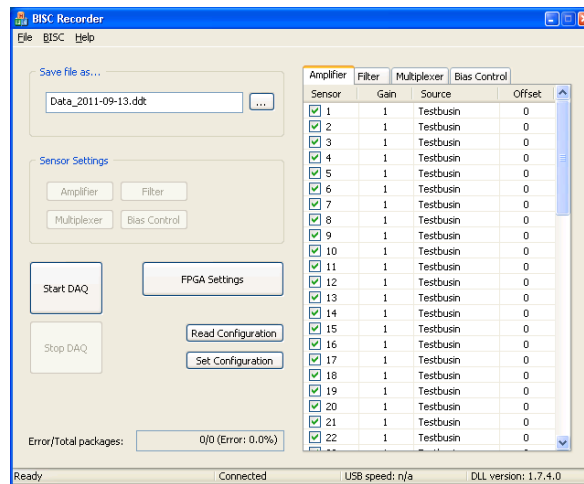


Abbildung A.5 Software *BISCRecorder* zur einfachen Konfiguration aller Hardwarekomponenten.

Die Software *BISCInspector* (Abbildung A.6) wurde zur Darstellung der abgeleiteten Signale konzipiert. Auch hier konnten wichtige Erkenntnisse bei der Darstellung für Weiterentwicklungen genutzt werden.

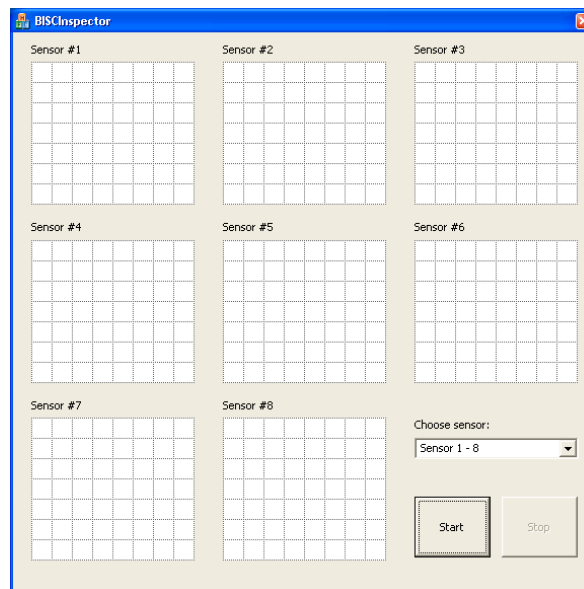


Abbildung A.6 Software *BISCInspector* dient der visuellen Darstellung der abgeleiteten Signale.

B Teager Energy Operator

Der Teager Algorithmus [214] benötigt drei benachbarte Abtastwerte, mit denen durch drei arithmetischen Operationen pro Verschiebung effizient der Energiegehalt eines Signals bestimmt werden kann.

Digitalisierte Signale können in folgender Form

$$x_n = A \cos(\Omega n + \phi)$$

mit der Amplitude A und der digitalisierten Frequenz Ω (wobei $\Omega = 2\pi f / f_s$) dargestellt werden. Für drei aufeinander folgende digitalisierte Punkte ergeben sich somit die Gleichungen

$$x_{n-1} = A \cos[(n-1)\Omega + \phi],$$

$$x_n = A \cos(\Omega n + \phi),$$

$$x_{n+1} = A \cos[(n+1)\Omega + \phi].$$

Nutzt man die trigonometrische Beziehung

$$\cos(\alpha + \beta) \cos(\alpha - \beta) = \frac{1}{2} [\cos(2\alpha) + \cos(2\beta)]$$

erhält man

$$x_{n+1} x_{n-1} = \frac{A^2}{2} [\cos(2\Omega n + 2\phi) + \cos(2\Omega)].$$

Weiterhin führt

$$\cos 2\alpha = 2 \cos^2 \alpha - 1 = 1 - 2 \sin^2 \alpha$$

zu folgendem Ergebnis

$$x_{n+1} x_{n-1} = A^2 \cos^2(\Omega n + \phi) - A^2 \sin^2(\Omega). \quad (\text{B.1})$$

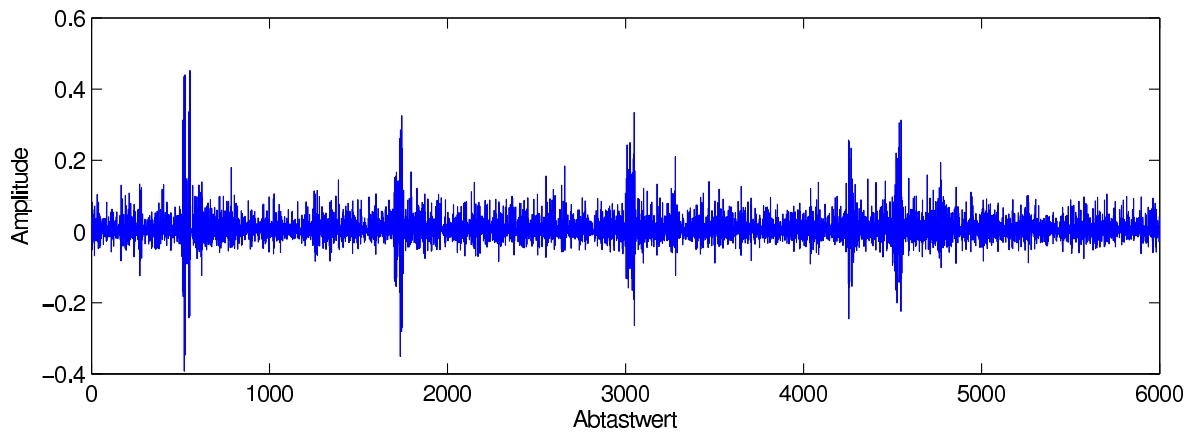
Der erste Term auf der rechten Seite in Gleichung B.1 entspricht dem Quadrat von x_n . Durch Ersetzen und Umstellen der Gleichung erhält man

$$A^2 \sin^2(\Omega) \cong E_n = x_n^2 - x_{n+1} x_{n-1} \quad (\text{B.2})$$

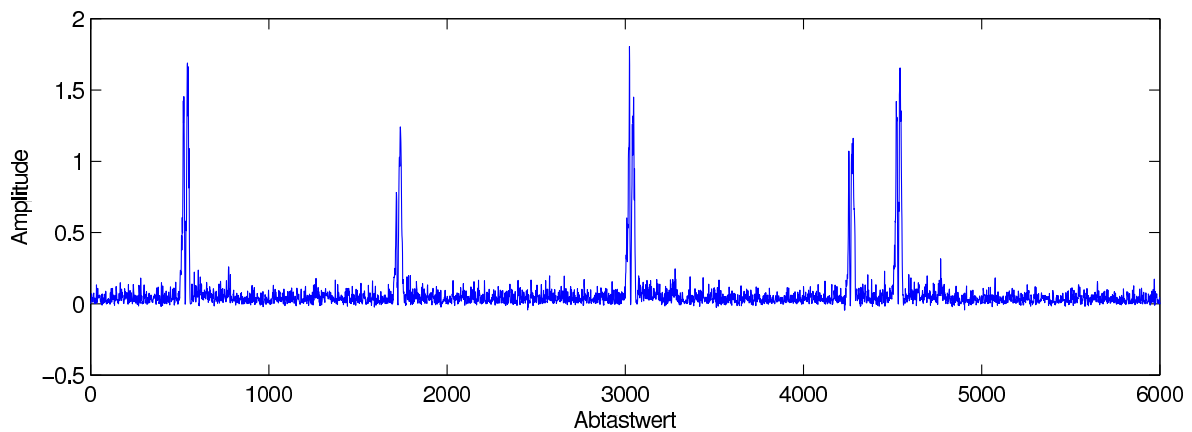
Verbesserungen bei der Detektion von Aktionspotenzialen können dadurch erzielt werden, wenn der Teager-Algorithmus auf bandbegrenzte Signale angewendet wird. In der praktischen Verwendung konnte ebenfalls festgestellt werden, dass die modifizierte Version von Gleichung B.2 nach Gleichung B.3 zu einem größeren Unterschied zwischen Nutzsignal- und Störsignalpegeln führt und damit eine bessere Erkennung von Aktionspotenzialen ermöglicht wird.

$$E_n = x_n^2 + x_{n+1}x_{n-1} \quad (\text{B.3})$$

Anhand der beiden Darstellung in Abbildung B.1 werden die Unterschiede zwischen Gleichung B.2 und Gleichung B.3 deutlich. In der oberen Abbildung (a) wird das Produkt aus x_{n-1} und x_{n+1} vom Quadrat des aktuellen Abtastwertes (x_n^2) subtrahiert, in der unteren Abbildung (b) dagegen addiert.



(a) Originale Berechnung von TEO nach Gleichung B.2



(b) Modifizierte Berechnung von TEO nach Gleichung B.3

Abbildung B.1 Vergleich beider TEO-Versionen.

C Simulationsparameter

Um eine Reproduzierbarkeit der Arbeitsschritte und Ergebnisse zu gewährleisten, werden im nachfolgenden Abschnitt alle verwendeten Skripte und die dazugehörigen Parameter zusammengefasst.

C.1 Verzeichnisstruktur der Datensätze und Matlab-Skripte

Neben der Beschreibung verwendeter Parameter wurde darauf geachtet, dass alle notwendigen Matlab-Skripte in digitaler Form auf dem beigefügten Datenträger zu finden sind.

```
Matlab\  
  Detrending+Denoising\  
    Denoising.m  
    Denoising4.m  
  Testsignalerzeugung\  
    Testsignal.mat  
    Testsignalerzeugung.m
```

C.2 Filter

Elliptisches Bandpass-Filter

Bei der Filterung hat es sich gezeigt, dass ein vorgelagertes Bandpassfilter Signal verzerrungsfreier filtert, als ein FIR- oder Waveletfilter. Zur Erstellung des Filters wurde das FDA-Tool in der Simulink-Toolbox

FDA-Tool in Matlab:

- Bandpass, IIR: Elliptic
- Order: 2
- Unit: Hz
- Fs: 20.000
- Fpass1: 300
- Fpass2: 3.000

C.3 Testsignalgenerierung

Das Script ermöglicht durch Variablen die Festlegung einzelner Parameter wie Signallänge (`len` in ms), Abtastfrequenz (`fs` in Hz) sowie Modellparameter (`model`) und kann durch nachfolgenden Befehl aufgerufen werden. Eine ausführlichere Beschreibung ist in Abschnitt C.3 zu finden.

```
[intra extra peaks] = spikesamples('len', 2000, 'fs', 20000);
```

Im Vektor `intra` und `extra` werden jeweils das intern und extern abgeleitete Signal gespeichert. Die Zeit, in denen ein Aktionspotenzial auftritt, werden im Vektor `peaks` abgelegt. Unter Zuhilfenahme der Matlab-Funktion `awgn()` kann dem externen Vektor gaußverteiltes weißes Rauschen hinzugefügt werden.

Zur Generierung der Testsignale werden MATLAB-Scripte von [324] eingesetzt. Die vorhandenen Scripte wurden um einen Parameter erweitert, der es erlaubt, einen manuellen Wert für den Signalrauschabstand (SNR) einzutragen. Der Wert für `NoiseSNR` ist in Dezibel (dB) anzugeben.

Aufruf des Scripts `generatenoisysamples.m` mit:

Listing C.1: Generierung des Vergleichssignals (SNR 100dB)

```
[signal target r1] = generatenoisysamples(...  
    'Duration', .3,...           % signal duration in seconds  
    'SampleRate', 40000,...     % sampling rate  
    'NoiseSNR', 100,...        % signal to noise ratio  
    'N_Jitter', 0,...          % number of jittered spike trains  
    'N_Uncorr', 0);           % number of uncorrelated spike trains
```

Soll ein Testsignal auf Basis eines vorher erzeugten Signals generiert werden, so können die bereits verwendeten (zufällig erzeugten) Parameter mittels `ReuseTargets` verwendet werden.

Listing C.2: Verwendung gleicher Targets

```
[signal target r1] = generatenoisysamples(...  
    'ReuseTargets', target,... % use same spike timestamps  
    'Duration', .3,...         % signal duration in seconds  
    'SampleRate', 40000,...    % sampling rate  
    'N_Jitter', 0,...          % number of jittered spike trains  
    'N_Uncorr', 0,...          % number of uncorrelated spike trains  
    'NoiseSNR', 2);           % signal to noise ratio
```

Mit Hilfe von `noisypsikegenerator.m` wird ein Signal mit x unterschiedlichen *Units* erzeugt. Anhand der Zeitinformationen in `target(x).targettimes` können die einzelnen Spikes extrahiert werden.

Listing C.3: Extraktion von Spikes

```
for x = 1:numel(target)
    for i = 1:numel(target(x).targettimes)-1
        start = uint32(target(x).targettimes(i)*fsample);
        spike(d).data = signal(start:(start + numSamples - 1));
        spike(d).time = start;
        spike(d).unit = x;
        d = d + 1;
    end
end
```

Testsignalgenerierung nach [323]. Aufruf der Funktion mit:

```
[intra extra peaks] = spikesamples('len', 2000, 'fs', 20000, 'model', 1);
```

len = Länge des Signals in Millisekunden

fs = Abtastfrequenz in Hertz

model = Modellparameter

C.4 Vergleich unterschiedlicher Wavelets

Verzeichnis: Matlab/Vergleich Wavelets/

Testsignal gespeichert in Testsignal.mat. Erzeugung des Signals mit Testsignalerzeugung.m.

Denoising mit Denoising.m. Benötigt dafür werden Matlab, Wavelet Toolbox, Noisy Spike Generator [316]

C.5 Eigene Matlab-Funktionen

Verschiedene, oft benötigte Algorithmen wurden in eigenen Matlab-Funktionen implementiert. Auf dem beigefügten Datenträger sind diese im Verzeichnis *Matlab/Tools* zu finden.

Listing C.4: visushrink.m

```
function thr = visushrink(coeffs)
    sigma = mad(abs(coeffs))/0.6745;
    thr = sigma*sqrt(2*log(length(coeffs)));
end
```

Listing C.5: sad.m

```
function [out] = sad(x)
    out = zeros(length(x),1);
    for i = 2:length(x)-1
```

```
        out(i) = x(i)^2+(x(i-1)*x(i+1));  
    end  
end
```

D Softwarepakete

Während technische Details zu MEAs und Sensortechnik nur selten veröffentlicht werden, erfolgt in zunehmendem Maße die Bereitstellung von Software zur Auswertung neuronaler Signale. Dabei haben sich neben kompletten Programmen vor allem Matlab-Skripte und Software-Bibliotheken in C/C++ als praktikabler Weg erwiesen. Diese sind unabhängig von der eingesetzten Hardware sowie dem Betriebssystem und lassen sich für eigene Anwendungen modifizieren.

Es werden sowohl frei verfügbare als auch kommerzielle Softwarepakete vorgestellt, die entweder zur Auswertung eigener Daten eingesetzt werden können oder als Benchmark für neue Algorithmen und Verfahren dienen. Die nachfolgende Liste wurde dabei weder auf Vollständigkeit geprüft noch kann sichergestellt werden, ob die entsprechenden Versionen weiterentwickelt werden und damit dem aktuellen Stand entsprechen.

D.1 Open-Source Software

Neben Programmen, die die vollständige Signalverarbeitungskette abdecken, wurden auch Algorithmen für einzelne Aufgabenbereiche veröffentlicht. Hauptsächlich betrifft dies die Clusterung von Signalen. *KlustaKwik* [59] ist ein Programm zur unüberwachten Klassifikation kontinuierlicher Neurosignale. Im Vordergrund standen Geschwindigkeit und Robustheit gegenüber Rauschen und anderen Artefakten. Die Quellen sind in C++ vorhanden und unter der *General Public License* (GPL) veröffentlicht (<http://klustakwik.sourceforge.net>). In der aktuellen Version wurde zudem eine Methode zur automatischen Trennung und Zusammenführung von Clustern implementiert, die gleichzeitig überprüft, ob sich dadurch eine bessere Gesamtperformance ergibt. *MClust* [359] wurde für Matlab entwickelt und ermöglicht automatisches sowie manuelles Clustern von Daten aus Einzelelektroden, Stereotroden und Tetroden. Eine ausführliche Dokumentation und der Quellcode sind über <http://mclust.sourceforge.net> erhältlich. Ein recht einfaches Programm stellt *Klusters* [360] dar, mit dem lediglich Aktionspotenziale manuell analysieren kann.

In etwas umfangreicheren Sammlungen wurden Algorithmen gebündelt und optimiert, mit denen *Spike sorting* ermöglicht wird. Von [168] entwickelte Algorithmen zur schnellen Erkennung und Sortierung von Spikes wurden in *Wave_clus* integriert. Durch den Einsatz von Wavelets sowie superparamagnetischem Clustern wurde eine unüberwachte Methode implementiert, die unter Matlab auf Windows, Linux und MacOS verfügbar ist. *SpikeOmatic* [361] nutzt für die Sortierung neben den klassischen Algorithmen zwei Modelle zur Datenerzeugung: i) ein einfaches Modell zur Gaussverteilung sowie ii) ein aufwändiges dynamisches *Hidden Markov* Modell. Durch die

Verwendung der freien Statistiksoftware und Programmiersprache *R* (<http://www.r-project.org>) kann einerseits auf bereits integrierte Algorithmen für die Signalverarbeitung sowie Clusteralgorithmen zurückgegriffen und zum anderen die zahlreichen Funktionen zur Visualisierung genutzt werden. Das Paket *OSort* ist ein weiterer Ansatz zur automatisierten Auswertung von Signalen. Die Software wurde für Matlab entwickelt und beinhaltet verschiedene Algorithmen zur Erkennung und Sortierung von Spikes in Echtzeit. Eine ausführliche Dokumentation sowie ein Vergleich zwischen *OSort*, *Wave_clus* *KlustaKwik* ist in [362] zu finden.

MEABench [363] besteht aus einer Sammlung von Programmen (Linux, MacOS), um Signale von MEA60-Systemen der Firma MultiChannel Systems [364] aufzuzeichnen und in Echtzeit zu verarbeiten. Die modularen Komponenten stehen als Bibliothek sowie C++-Code zur Verfügung und können um eigene Komponenten erweitert oder für andere Ableitungssysteme modifiziert werden. Bereits enthalten sind Module zur Filterung, On- und Offline-Detektion von Spikes, Entfernung von Stimulationsartefakten sowie Visualisierung von Spikes. Weitere Informationen sowie Bezug der Software unter <http://www.its.caltech.edu/~daw/meabench>.

Die *Chronux Analysis Software* [365] ist eine Sammlung von Matlab-Bibliotheken und wurde vom Mitra Lab im Cold Spring Harbor Laboratory entwickelt und zusammengestellt. Die Quellen der Software stehen unter der *Open Source*-Lizenz. Das Paket enthält eine Reihe an Programmen, die von der Vorverarbeitung bis zur Auswertung von *Spike trains* reicht und umfasst beispielsweise lokale Regressionsanalysen, Wahrscheinlichkeitsanalysen und Daten-Segmentierungen. Chronux stellt außerdem eine grafische Benutzeroberfläche zur Verfügung und erlaubt den Import unterschiedlicher freier als auch kommerzieller Datenformate. Weiter Informationen sind unter der Webadresse <http://www.chronux.org> beziehungsweise in [166, 322, 366] zu finden.

sigTOOL [367] besteht aus einer Sammlung von Matlab-Skripten und stellt verschiedene Funktionen (arithmetisches Mittel, Mittelwert, Auto- und Kreuzkorrelation, Spektraldichtefunktion, Kohärenzschätzer, digitale Filter, Resampling und Amplitudenverteilung) zur Analyse von Spikes aber auch *Spike trains* (unter anderem durch *Wave_clus*) zur Verfügung. Darüber hinaus wird die *Independent Component Analysis* (ICA) durch *FastICA* [368] unterstützt. Der Datenimport erfolgt mit Hilfe von *NeuroShare*. Zahlreiche Exportformate für beispielsweise Excel, Origin, SigmaPlot sowie diverse Bildformate werden bereitgestellt. Die Software kann unter <http://sigtool.sourceforge.net> bezogen werden.

Finding Information in Neural Data (FIND) [320] ist ein plattformunabhängiges Analysewerkzeug und dient zur Auswertung von Signalen aus Mehrfachableitungen, zur Simulation von Netzwerken sowie zur Visualisierung von Daten. Die quelloffenen Skripte wurden für Matlab entwickelt und decken fast die vollständige Signalverarbeitungskette von der Detektion bis zur Auswertung von *Spike trains* ab. Die gut dokumentierte und offene Architektur erlaubt eine gute Integration neuer Verfahren. Neben einer Reihe kommerzieller Datenformate, die durch die Einbindung der *NeuroShare*-Schnittstelle unter Windows zur Verfügung gestellt werden, wurden unter Linux

zahlreiche weitere, vor allem frei verfügbare Importfunktionen integriert. Weitere Informationen zur aktuellen Version 1.1 vom Dezember 2008 befinden sich auf <http://find.bccn.uni-freiburg.de>.

Durch unzählige Forschungsvorhaben wurden in den letzten Jahrzehnten viele unterschiedlichen Algorithmen und Methoden entwickelt. Zusammen mit eigenständigen Datenformaten des jeweiligen Forschungsinstituts ist es teilweise mit sehr viel Aufwand verbunden, bereits vorhandenes Wissen mit neuen Erkenntnissen zu verknüpfen. Um dieses Problem zu lösen, soll vom *German Neuroinformatics Node* (G-Node) eine neurartige Software- und Hardwareinfrastruktur entwickelt werden, die auf einer gemeinsamen Basis neben der Datenakquise und -speicherung auch die Analyse experimenteller Daten ermöglichen soll [369, 370]. Die Standardisierung von Formaten für den Austausch von Daten soll eine gemeinsame Forschungsgrundlage bieten und so den Austausch von Erkenntnissen innerhalb der *Community* fördern. Aktuelle Informationen zum Stand der als *Open Source* veröffentlichten Standards sowie der Toolbox-Entwicklung sind unter <http://www.neuroinf.de> abrufbar.

Ähnliche Ziele eines gemeinsamen Standards zum Austausch von Algorithmen und Daten werden von einem Konsortium britischer Forschungsinstitute sowie kommerzieller Partner unter dem Namen *Code Analysis, Repository and Modelling for E-Neuroscience* (CARMEN) verfolgt. Wesentliche Schwerpunkte liegen im Aufbau einer Infrastruktur zum Austausch von Daten, wissenschaftlichen Dokumenten und Diskussionen aber auch einer Plattform, um Wissen und Ergebnisse zu bündeln [371]. Damit soll der Aufbau eines virtuellen Labors (unter <http://www.carmen.org.uk/>) forciert werden, um künftig unterschiedlichste Forschungsvorhaben im neurowissenschaftlichen Bereich zu bündeln und Daten aus verschiedensten Quellen zur Generierung neuer Erkenntnisse zu nutzen [372].

D.2 Kommerzielle Software

Alpha-Sort (<http://www.alphaomega-eng.com>) von Alpha Omega ist ein Offline-Spikesorter. Spikeinformationen werden durch zweidimensionale Hauptkomponenten charakterisiert. Das Paket enthält einerseits Programme um Spikes zu klassifizieren aber auch die Ergebnisse zu bewerten.

OpenSorter (<http://www.tdt.com>) von Tucker-Davis Technologies bietet verschiedene mächtige Sortierfunktionen, bspw. Bayessche Erwartungswertmaximierung (*bayesian expectation-maximization*), *k*-means und *closest-center*-Algorithmen sowie Möglichkeiten zur manuellen Clusterbestimmung und Waveform-Auswahl.

OfflineSorter (<http://www.plexoninc.com>) von Plexon Inc. beschleunigt den Prozess des Findens und der Klassifizierung von Aktionspotenzialen, die mittels einzelnen Elektroden sowie Stereotroden und Tetroden abgeleitet wurden. Spikes können in einem zwei- oder dreidimensionalen

Eigenschaftsraum dargestellt werden mit einer Vielzahl an manuellen, semiautomatischen oder vollautomatischen Möglichkeiten zum Clustern der Spikes. Der Offline-Sorter kann darüber hinaus zur Extraktion von Spikes aus kontinuierlichen Daten mit verschiedenen Schwellwertfunktionen genutzt werden. Die Eigenschaften der *Waveforms* und statistische Informationen können nach MATLAB, Excel oder in Textdateien exportiert werden.

NeuroExplorer (<http://www.neuroexplorer.com>) von Nex Technologies beinhaltet eine Vielzahl von Analyseoptionen wie beispielsweise Standardhistogramme und Rasteranalysen, Verschiebungsprediktoren für Kreuzkorrelationen und farbliche Markierungen in periverten Rastern, gemeinsame Peristimulishistogramme, Burstanalysen sowie weitere Analysemöglichkeiten und -funktionen und bietet eine direkte Anbindung an MATLAB und Excel.

SpikeSort3D (<http://www.neuralynx.com>) aus dem Hause Neuralynx bietet die Möglichkeit, Neuralynx-Daten in Matlab, ASCII-Text und Excel zu konvertieren. Echtzeitanzeigen in Kombination mit Echtzeitclusteranalysen ausgewählter Zellen unterstützen den Anwender mit präzisen Werkzeugen zur Untersuchung von Daten aus Experimenten.

MC_Rack von MultiChannel Systems (www.multichannelsystems.com) kombiniert mit der Hardware MC_Card und MC_Rack bildet ein System für die zuverlässige Akquise und Analyse elektrophysiologischer Daten. Die Software beinhaltet ein virtuelles Oszilloskop, Filter, einen *Event detector*, einen *Spike sorter* und verschiedene Analysewerkzeuge.

AutoSort (<http://www.dwavetech.com>) von DataWave Technologies ist ein Plugin zur mehrdimensionalen Spikeanalyse aus gespeicherten und Echtzeitdaten.

Cerebus von Cyberkinetics Neurotechnology Systems, Inc. (<http://www.cyberkineticsinc.com>) bietet eine schnelle automatische Echtzeiterkennung und Klassifikation von Spikes. Neuronale Aktivitäten werden automatisch mit einem Hüllkurvendetektor erkannt, wobei fortlaufend der Rauschanteil im Signal bestimmt und entsprechend adaptiert wird. Die erkannten Aktionspotenziale werden anschließend automatisch mit einer Kombination aus *Template-Matching*-Verfahren und Eigenschaftsanalyse klassifiziert.

Cambridge Electronic Design: Spike2 (<http://www.ced.co.uk/spk6wglu.htm>) identifiziert und sortiert einzelne sowie mehrfache Aktivitäten von Spikes *offline* als auch *online*. Es ist in der Lage, Daten aus bis zu 32 Kanälen mit einfachen Schwellwerten oder mittels *Template matching* zu erkennen. Extrahierte Spikes können mittels PCA in Cluster transformiert und weiter analysiert werden.

NeuroMAX (<http://www.neuromax.org>) ist eine Matlab-basierte kommerzielle Sammlung von Toolboxen für die Detektion, das Sortieren, die Analyse sowie die grafische Darstellung von Spikes bzw. Spike-Trains. Um eine Vielzahl kommerzieller und freier Datenformate bearbeiten zu können, erfolgt der Dateizugriff über NeuroShare. Enthaltene Werkzeuge sind beispielsweise FeatureExtract (Merkmalsextraktion), KMeansCluster (Clustering), Assign2Cluster und Template2NeuralEvent

(Klassifikation), sowie QAcc (Quantify Accuracy Tools) um mittels künstlichen Datensätzen die Spike-Sorting-Qualität zu prüfen.

Eigenständigkeitserklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, keine anderen als die angegebenen Quellen benutzt und in den verwendeten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Gerold Bausch

Thesen zur Dissertation

1. Zellen bilden die kleinste biologische Einheit, die imstande ist, Informationen zu verarbeiten.
2. Der Informationsaustausch von Zellen basiert auf einem kontrollierten Austausch von Ionen. Durch einen Stimulus, der chemisch, mechanisch oder elektrisch erfolgen kann, wird eine Veränderung des Membranpotenzials hervorgerufen. Beim Überschreiten eines Schwellwerts entsteht ein Aktionspotenzial.
3. Aktionspotenziale lassen sich mit Hilfe von Multielektroden-Arrays (MEAs) aus Zellen ableiten.
4. Um komplexe Funktionsweisen in Zellnetzwerken zu untersuchen, muss eine große Anzahl von Zellen gleichzeitig überwacht werden.
5. Die zu untersuchenden lebenden Zellen sind weitestgehend stochastische Systeme. Um daraus abgeleitete Signale verarbeiten und anschließend interpretieren zu können, sind vor allem adaptive Verarbeitungsalgorithmen geeignet.
6. Aufgrund der hohen Datenmenge, die durch die große Anzahl von Sensoren auf einem Multielektroden-Array entstehen, ist für eine Echtzeitauswertung und für den Einsatz in kommerziellen Systemen eine vollständig automatisierte sowie unüberwachte Signalverarbeitung notwendig.
7. Eine Verarbeitung von Signalen in Echtzeit verringert die zu speichernde Datenmenge und eröffnet neue Anwendungsfelder.
8. Wavelet-basierte Filterstufen verbessern das Signalrauschverhältnis abgeleiteter Signale und können effizienter und flexibler als vergleichbare FIR-Filter eingesetzt werden.
9. Wavelet-basiertes *Denoising* unter Zuhilfenahme weiterer Informationen aus benachbarten Sensoren kann zu einer Verbesserung der Filterergebnisse führen.
10. Wird das wavelet-basierte *Denoising* bei kurzen Signalausschnitten durchgeführt, entstehen an den Grenzen Unstetigkeiten, die zu Signalverzerrungen führen und Aktionspotenziale stark verändern.
11. Durch die Verwendung einer redundanten Wavelet-Transformation können Signalartefakte reduziert werden.

12. Aktionspotenziale treten in zeitlich diskreten Abschnitten auf. Störanteile dagegen sind quasi-stationär im gesamten Signalverlauf vorhanden. Durch die Analyse der Wavelet-Koeffizienten in reinen Störsignalbereichen kann ein besseres *Denoising* erreicht werden.
13. Adaptive Verfahren, basierend auf neuronalen Netzen, können zur echtzeitbasierten Extraktion von Merkmalen eingesetzt werden und passen sich an ändernde Signaleigenschaften an.
14. Mit Hilfe von zusätzlichen Kriterien lässt sich mittels *k*-means die Anzahl von Clustern automatisch bestimmen.
15. Neuronale Netze ermöglichen eine Echtzeit-Klassifikation abgeleiteter Neuronensignale.
16. Die vorgestellten Algorithmen ergänzen die bereits vorhandenen Komponenten des *Spike sorting* und ermöglichen eine unüberwachte Auswertung einer unbekannt Anzahl linear kombinierter Aktionspotenziale, sofern bestimmte Annahmen hinsichtlich der abgeleiteten Signalqualität zutreffen.

Glossar

Active Pixel Sensor

Ein *Active Pixel Sensor Array* besteht aus einer in CMOS-Technologie gefertigten Sensormatrix zu aktiven Ableitung elektrophysiologischer Signale [118].

Aktionspotenzial

Ein Aktionspotenzial ist eine kurzzeitige, in ganz charakteristischer Form ablaufende Abweichung des Membranpotenzials einer Zelle von ihrem Ruhemembranpotenzial. Die Fähigkeit zur Ausbildung von Aktionspotenzialen ist die grundlegende und definierende Eigenschaft elektrisch erregbarer Zellen, der Neuronen (Nervenzellen) und Muskelzellen. Aktionspotenziale ermöglichen die Erregungsleitung im Nervensystem und die Kontraktion der Muskulatur.

Burst

Ein Burst ist eine schnelle Folge von Aktionspotenzialen, die beispielsweise bei einer starken Reizung von Neuronen auftreten können. Während eines Bursts kann es zu Veränderungen der Form von Aktionspotenzialen kommen, da der notwendige Zeitraum zur vollständigen Regeneration des Neurons unter Umständen zu kurz ist. Dies wiederum wirkt sich negativ auf die Auswertung des Signals aus.

Cell Monitoring System

Das *Cell Monitoring System* wurde unter anderem an der Universität Rostock entwickelt und dient der multiparametrischen Beobachtung (Temperatur, pH-Wert, Elektrisches Potenzial) von Zellnetzwerken. Neben Stoffwechselaktivitäten können auch elektrophysiologische Aktivität gemessen werden. Näheres dazu unter Biosensor Typ C (BISC).

Cluster

Cluster sind Gruppen zusammengehöriger Objekte aus einer Grundmenge von numerisch beschriebenen Objekten. Die Objekte können Datensätze von Messwerten sein, in denen geordnete Ansammlungen oder Hierarchien gefunden werden sollen.

CPFET

Feldeffekttransistor zur Bestimmung von Zellpotenzialen (CPFET, engl. *cell potential field effect transistor*).

Digitaler Signalprozessor

Ein digitaler Signalprozessor dient der kontinuierlichen digitalen Bearbeitung analoger Signale (Audio, Video). Durch spezielle Hardware können sehr häufig auftretende und rechenintensive Befehle (MAC, Multiply and Accumulate) in nur einem Befehl abgearbeitet werden.

Diskrete Wavelet-Transformation

Die Wavelet-Transformation ist eine spezielle Form der Frequenztransformation. Als Basisfunktionen verwendet man Wavelets. Der Vorteil gegenüber der Fourier-Transformation ist die zeitliche Lokalität der Basisfunktionen und die geringe Komplexität $O(N)$, im Gegensatz zu $O(N \times \log N)$ bei der Fourier-Transformation.

Elektrophysiologie

Die Elektrophysiologie ist ein Teilbereich der Neurophysiologie und befasst sich mit den elektrischen und chemischen Zusammenhängen bei der Signalübertragung und -verarbeitung innerhalb von Nervenzellen und -systemen.

False negative

Wird ein Aktionspotenzial aufgrund seiner geringen Amplitude von einem *Spike*-Detektionsmechanismus nicht erkannt, so spricht man von einem *false negative*.

False positive

Als *false positive* wird ein vermeintlicher Störsignalanteil bezeichnet, der aufgrund seiner Amplitudenhöhe von einem *Spike*-Detektionsmechanismus erkannt wurde.

Field Programmable Gate Array

Ein *Field Programmable Gate Array* (FPGA) ist ein frei programmierbarer Logikschaltkreis, der aus konfigurierbaren Logikblöcken, Leiterbahnen zur Verbindung dieser Blöcke und Ein- bzw. Ausgangstreibern von I/O-Pins des Gehäuses besteht. Mit ihnen können Algorithmen in Hardware umgesetzt werden, wodurch eine sehr hohe Verarbeitungsgeschwindigkeit und Parallelität erzielt wird.

Gliazellen

Gliazellen bilden ein Stützgerüst für Nervenzellen und sorgen für die gegenseitige elektrische Isolation von Nervenzellen. Zudem sind sie unter anderem maßgeblich am Stoff- und Flüssigkeitstransport beteiligt. Gliazellen sind deutlich kleiner als Nervenzellen und bilden beim Kontakt zwischen Nervenzelle und Sensor eine Art Isolation.

Hauptkomponentenanalyse

Die Hauptkomponentenanalyse (engl. *Principal Component Analysis* (PCA)) ist eine lineare Transformation, bei der Daten so in ein neues Koordinatensystem eingeordnet werden, dass

die größte Varianz auf der ersten Achse, die zweitgrößte Varianz auf der zweiten Achse und so weiter abgebildet werden. Damit wird zum einen die Dimension reduziert, wobei die wichtigsten Eigenschaften eines Datensatzes erhalten bleiben.

in vitro

(*lat.* im Glas) bezeichnet organische Vorgänge oder Prozesse, die außerhalb eines lebenden Organismus stattfinden. Beispielsweise ist damit ein Experiment gemeint, bei dem Zellen aus einem Organismus auf einen Sensorchip übertragen werden und mit künstlichen Hilfsmitteln dafür gesorgt wird, dass deren (biologische) Funktionen in einem gewissen Rahmen für Untersuchungen weiter erhalten bleiben.

in vivo

Als *in vivo* (*lat.* im Lebendigen) werden Prozesse bezeichnet, die im lebenden Organismus ablaufen. Möchte man hierbei Funktionen untersuchen, so werden nicht Zellen aus einem Organismus übertragen, sondern Sensoren in einem lebenden Organismus so implantiert, dass wichtige Informationen gemessen werden können, aber generelle Funktionen möglichst nicht gestört werden.

ISFET

Ionen-sensitiver Feldeffekttransistor zur Bestimmung des pH-Werts.

Metabolismus

Der Metabolismus (dt. Stoffwechsel) steht für die Aufnahme, den Transport und die chemische Umwandlung von Stoffen in einem Organismus sowie die Abgabe von Stoffwechselendprodukten an die Umgebung.

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.

Quadrature Mirror Filter

Spezielle Eigenschaften von digitalen Filtern, welche das Eingangssignal in zwei Frequenzbänder aufteilen und jeweils um den Faktor 2 heruntersamplen. Das Hochpassfilter besitzt dabei invertierte Tiefpassfilterkoeffizienten in der Form.

Rezeptor

Ein Rezeptor ist ein sensorisches Nervenende, welches auf bestimmte physikalische Änderungen wie beispielsweise Druck, Temperatur oder Lichtstärke reagiert und den physikalischen

Reiz in ein Rezeptorpotenzial umwandeln kann. Dieses Rezeptorpotential kann von angrenzenden Nervenzellen verarbeitet werden, so dass die Information über einen Reiz im Zentralnervensystem ankommt [4].

Supervised Learning

Beim überwachten Lernen wird dem System anhand von Trainingsdaten ein Sollzustand vorgegeben, anhand dessen der Optimierungsalgorithmus die Wichtungen der einzelnen Filter so adaptieren soll, dass der Fehler zwischen Soll- und Ist-Zustand ein Minimum erreicht.

Template

Ein Template ist ein Muster, welches zum Vergleich und somit zur Einordnung (Klassifikation) genutzt werden kann.

Unit-Separation

Bei der Ableitung neuronaler elektrischer Signale kann es aufgrund hoher Dichten in neuronalen Netzen zur gleichzeitigen Signaleinkopplung mehrerer Neuronen auf ein und dieselbe Elektrode kommen. Zur Auswertung sind jedoch Anzahl und Zeitpunkt von einzelnen Aktionspotenzialen notwendig, so dass eine Separation der Spikes (auch Unit genannt) *a priori* erfolgen muss.

Unsupervised Learning

Als unüberwachtes Lernen wird ein maschineller Vorgang bezeichnet, bei dem ein Algorithmus aus Eingangswerten Ausgangswerte berechnet, ohne eine Zielvorgabe mittels Trainingsdatensatz.