

ZPRACOVÁNÍ INTRAKRANIÁLNÍHO EEG V MODELU TEMPORÁLNÍ EPILEPSIE

J. Kudláček^{1,2}, P. Jiruška^{1,2,3}

¹ Fakulta elektrotechnická, České vysoké učení technické v Praze; ²Fyziologický ústav, Akademie věd České republiky; ³2. Lékařská fakulta, Univerzita Karlova v Praze;

Abstract

Epilepsie je chronické onemocnění mozku charakterizované výskytem spontánních a opakovaných epileptických záchvatů. Porozumění dynamice, funkční organizaci a úloze jednotlivých struktur limbického systému je klíčové pro zkvalitnění její léčby. Za tímto účelem jsme vypracovali metodiku multikanálových záznamů elektrické aktivity mozku laboratorních potkanů. Elektrická stimulace navíc umožňuje snímání evokovaných potenciálů. Epilepsie byla u potkanů vyvolána aplikací 10 ng tetanotoxinu do pravého dorzálního hipokampu. Dlouhodobé, multikanálové nahrávání intrakraniálního EEG po dobu 2-4 týdnů umožňuje získání komplexní prostorové a časové informace o dynamice záchvatů a mezizáchvatových epileptiformních jevů a o jejich vzájemných interakcích. Měření evokovaných potenciálů je použitelné pro stanovení specifických parametrů mozkové aktivity, například jeho excitability, či úrovně inhibice. Vizuální zpracování záznamů je časově náročné, či téměř nemožné. Proto jsme v prostředí Matlab vytvořili program, který umožňuje semi-automatické zpracování a kvantifikaci jak spontánní epileptické aktivity, tak evokovaných potenciálů. Tento program umožňuje sekvenční zpracování jednotlivých souborů, během kterého je prováděna automatická detekce záchvatů, interiktálních epileptiformních výbojů a základních parametrů evokovaných potenciálů v jednotlivých kanálech. Automatická detekce je následně doplněna vizuálním hodnocením extrahovaných grafoelementů, které umožňuje identifikaci a odstranění falešných detekcí. Navržený software podstatně zvyšuje informační výtěžnost dlouhodobých záznamů, významně urychluje vizuální hodnocení získaných dat a otevírá prostor pro jejich další analýzu.

1 Úvod

Epilepsie je nejčastější chronické neurologické onemocnění, postihující cca 0,5 až 1 % populace ve vyspělých zemích. Přibližně třetina pacientů trpí farmakorezistentní epilepsií. Některým z nich může pomoci chirurgické odstranění části mozku zodpovědné za záchvaty, tzv. epileptogenní zóny. Její lokalizace však není vždy triviální.

Nalezení charakteristických rysů epileptogenní tkáně (tzv. biomarkerů) je důležité pro zkvalitnění předoperační diagnostiky a přesnější a jistější lokalizaci epileptogenní zóny. Vhodnými biomarkery jsou například specifické grafoelementy v záznamu elektrické aktivity mozku (EEG). V současnosti se jeví jako perspektivní interiktální (mezizáchvatové) výboje (IED – Inter-ictal Epileptiform Discharge) a vysokofrekvenční oscilace (HFO – High-Frequency Oscillation). Další užitečnou informací může být znalost charakteristického vzoru počátků záchvatové aktivity v různých mozkových strukturách a rovněž znalost šíření záchvatové aktivity mezi strukturami.

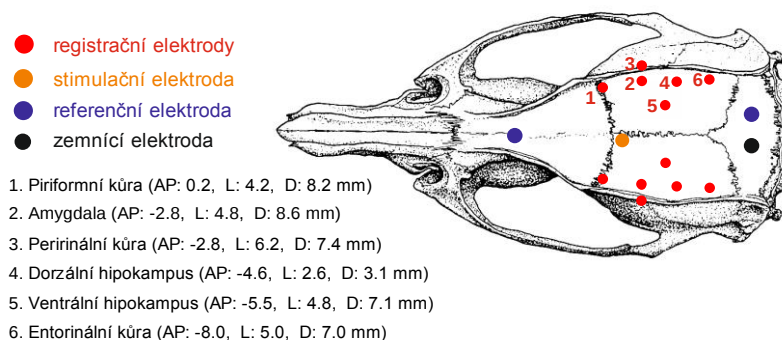
Analýza EEG rovněž potenciálně skýtá možnost odhadu pravděpodobnosti vzniku záchvatu nebo dokonce přímo predikce záchvatu. K tomu může sloužit např. změna v incidenci mezizáchvatových epileptiformních grafoelementů (IED nebo HFO) nebo změny parametrů evokovaných potenciálů. Proto je užitečná analýza dlouhodobé dynamiky záchvatů a epileptiformních jevů.

Nejčastějším typem epilepsie u člověka je epilepsie temporálního laloku, ve které je zasažen především hipokampus a ostatní struktury limbického systému. Proto jsme použili tetanotoxinový model epilepsie temporálního laloku v laboratorním potkanovi.

2 Metody

2.1 Implantace elektrod a injekce tetanotoxinu

Dospělým potkanům ($n = 4$) byly stereotakticky implantovány registrační elektrody oboustranně do klíčových struktur limbického systému dle Obr. 1. Twistované elektrody byly vyrobeny ze stříbrného poteflonovaného drátu. Bylo tedy implantováno celkem 12 twistovaných elektrod, což odpovídá 24 kanálům. Zároveň bylo do pravého dorzálního hipokampu injikováno 10 ng tetanotoxinu za účelem vyvolání epilepsie. Po týdenní rekonvalescenci bylo přikročeno k nahrávání spontánní i elektricky evokované aktivity. Bohužel u dvou potkanů nedošlo k rozvoji epilepsie, takže u nich nedocházelo k záchvatům. U zbylých dvou se epilepsie rozvinula, ale nefungovala stimulační elektroda, takže byly k dispozici pouze záznamy spontánní aktivity. Bohužel tedy nebyl k dispozici ani jeden epileptický potkan s funkční stimulační elektrodou. Pro vývoj algoritmů ke zpracování EEG signálů však získaná data plně postačují.



Obr. 1: Schéma implantace elektrod ve vztahu k lebce

2.2 Dlouhodobý video/EEG monitoring

Signály z elektrod byly nejprve proudově zesíleny napěťovým sledovačem Neuralynx HS-27 umístěným přímo na hlavě potkana, dále byly vedeny přes komutátor do měřicích zesilovačů Neuralynx nastavených na zesílení 196 a filtraci od 0,1 do 3000 Hz. Následně byly digitalizovány převodníkem CED 1401 na vzorkovací frekvenci 10 kHz a rozlišení 16 bitů a nahrávány do počítače prostřednictvím programu Spike2 do souborů typu *.smr.

Kromě toho bylo pomocí web kamery synchronně nahráváno video potkanů pro pozorování behaviorálních projevů epileptických záchvatů. Web kamera disponovala rovněž infračerveným snímáním a infračervenými osvětlovacími diodami pro noční záznamy.

Záznam probíhal v 30 minutových blocích, tj. v každém *.smr a *.avi souboru bylo 30 minut záznamu. Po dobu ukládání (cca 3 minuty) bylo nahrávání přerušeno. Potkani byli takto monitorováni 12 až 24 dnů.

2.3 Nahrávání elektricky evokovaných potenciálů

Stříbrná stimulační elektroda byla umístěna ve ventrální hipokampální komise, což je oblast, kterou procházejí vlákna spojující levý a pravý hipokampus. Bylo tedy možno stimulovat oba hipokampy, potažmo další struktury limbického systému touto jednou implantovanou elektrodou. Ke stimulaci byl využit stimulátor s proudovým zdrojem Digitimer DS3. Okamžiky stimulace byly řízeny programem Spike2 prostřednictvím TTL výstupu na převodníku CED 1401. Stimulační proud byl nastavován ručně. Parametry nahrávání evokovaných potenciálů byly stejné jako u nahrávání spontánní aktivity.

Stimulace byla využívána k měření vstupně-výstupní křivky, což je závislost velikosti odpovědi měřených struktur na intenzitě (proudu) stimulu. Vstupně-výstupní křivka může být užitečná například ke stanovení excitability mozku, tj. ochoty neuronů generovat akční potenciál. Intenzity stimulů byly mezi 20 a 350 μA . Mezi stimuly byla vždy pauza 40 s, celkový počet stimulů v jednom měření byl 15. Pořadí stimulů bylo náhodné. Měření bylo prováděno jednou denně, vzniklo tak několik cca 10 minutových *.smr souborů.

Po deseti dnech monitorování spontánní aktivity, při kterém byla jednou denně měřena vstupně-výstupní křivka, byly do dlouhodobého monitorování zařazeny pravidelné stimulace o intenzitě 140 μA v intervalu 15 sekund. Ty mohou být užitečné například pro získávání dlouhodobého profilu odpovědi a studium změn excitability mozku v souvislosti s epileptickými záchvaty, tak jako např. v [1]. V tomto pokusu však bylo cílem stanovení vlivu časté stimulace na vstupně-výstupní křivku, neboť stimulovaný potkan neměl spontánní záchvaty.

2.4 Zpracování nahraných signálů

Jelikož prohlížení nahraných záznamů přímo v syrové podobě, například v programu Spike2 by bylo neúnosně zdlouhavé a mělo by nízkou informační výtěžnost, byl v prostředí Matlab vytvořen program pro jejich semi-automatizované zpracování a prohlížení vybraných částí záznamu. Data byla ze souborů *.smr do Matlabu načítána pomocí MATLAB SON Library, která je součástí balíčku programů pro analýzu biologických signálů sigTOOL [2].

2.4.1 Zpracování záznamů z dlouhodobého monitoringu

EEG záznamy z dlouhodobého monitoringu mají celkovou velikost cca 0,5 až 1 TB, je tedy nemyslitelné zpracovávat je všechny najednou. Proto jsou zpracovávány sekvenčně. V cyklu je vždy načten jeden půlhodinový *.smr soubor (cca 800 MB) a v něm jsou zdetekovány potřebné události. V tomto případě jsou to záchvaty a IED. Pro detekci záchvatů byla využita funkce z [3] a pro detekci IED funkce z [4]. Software je však připraven pro snadnou implementaci dalších detektorů, např. detektoru HFO.

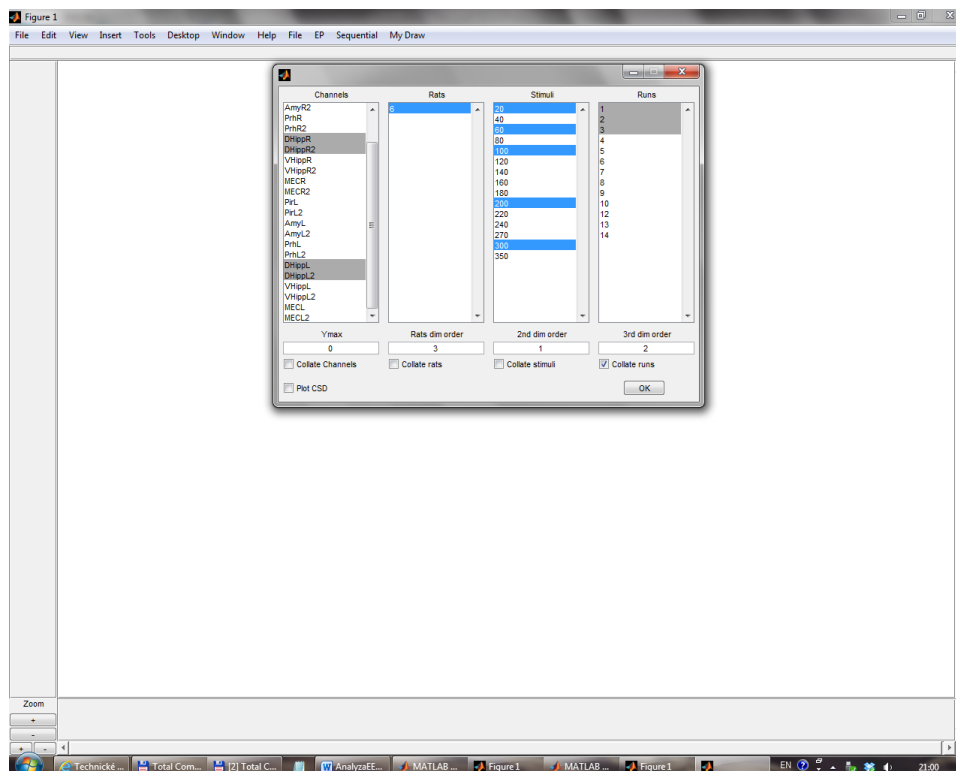
U zdetekovaného jevu (záchvat nebo IED) byl vždy uložen jeho začátek a konec do proměnné a tato proměnná byla uložena do souboru *.mat. Do jiného souboru *.mat byl uložen extrahovaný úsek signálu obsahující daný jev. Navíc byl ještě vytvořen *.mat soubor obsahující doplňující informace o daném *.smr souboru, jako datum vzniku, počet a názvy nahraných kanálů, délku záznamu apod. Ke každému *.smr souboru tak vzniklo 5 *.mat souborů. Začátky a konce záchvatů, začátky a konce IED, extrahované záchvaty, extrahované IED a informační soubor.

Detektor záchvatů byl nastaven na velkou citlivost, aby byla nízká pravděpodobnost, že nějaký záchvat nebude zdetekován. Takovéto nastavení však vedlo k nízké selektivitě. Proto byl v Matlabu vytvořen grafický modul pro zobrazování extrahovaných signálů. Falešné detekce záchvatů tak byly ručně odstraněny. Při tom byly záchvaty dále klasifikovány na krátké pod 10 s a dlouhé nad 10 s. Grafický modul rovněž umožňuje zoomování signálu a scrollování, takže je možná i hlubší vizuální analýza, například hledání struktury, ve které záchvat začíná nebo posuzování směru šíření záchvatové aktivity.

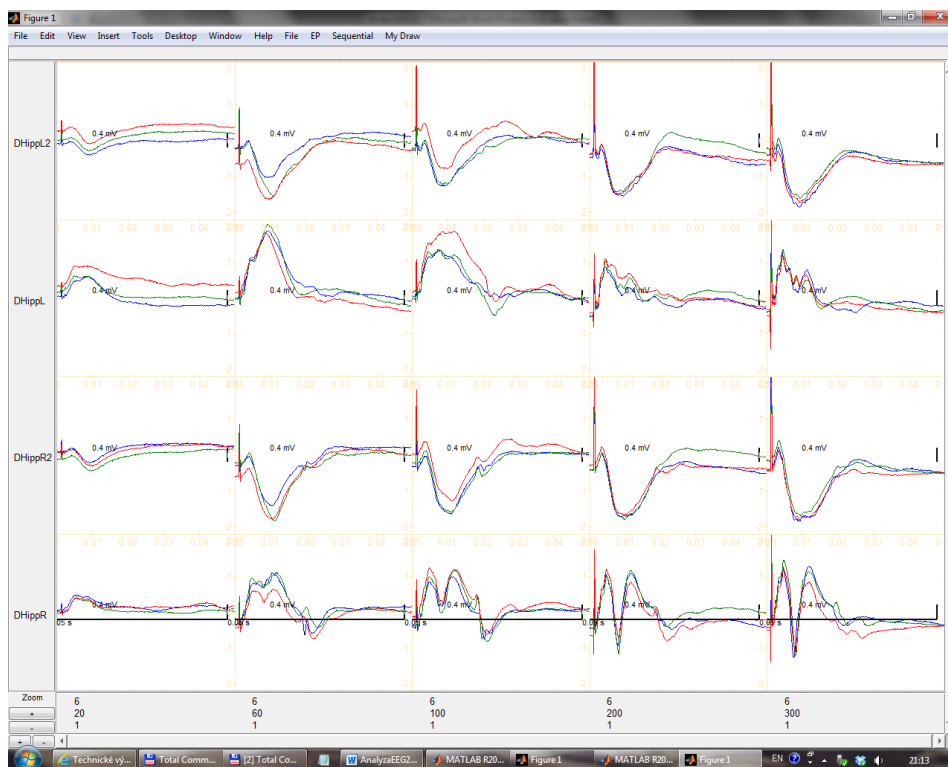
Po odstranění falešných detekcí záchvatů byla zobrazena dlouhodobá dynamika záchvatů a IED. Dlouhodobou dynamiku lze opět zoomovat i scrollovat.

2.4.2 Zpracování evokovaných potenciálů

Pro načítání evokovaných potenciálů sloužil pomocný *.xls nebo *.txt soubor obsahující jména a cesty k *.smr souborům, čísla potkanů, na kterých byly záznamy pořízeny a vektory intenzit stimulů. Podle digitálních markerů označujících stimulus obsažených přímo v *.smr souboru byly načteny pouze krátké (0,1 s) úseky signálu po stimulu. Tyto úseky byly organizovány do trojrozměrného cell array, kde v prvním rozměru je potkan, na kterém byla data pořízena, v druhém rozměru je intenzita stimulu a ve třetím rozměru o kolikáté měření na daném potkanovi se jedná. Toto uspořádání umožňuje snadné průměrování přes kterýkoli z těchto tří rozměrů nebo vybírání pro zobrazení a analýzu podle těchto parametrů. Rovněž je možné odečtení dvou signálů twistované elektrody, čímž vznikne jejich bipolární zapojení. To může být užitečné pro získání informace, zda je měřená aktivita lokálně generovaná nebo zda se k elektrodě dostává pasivním šířením z jiných struktur. Grafický modul opět umožňuje zobrazení evokovaných potenciálů v třídění podle uvedených tří rozměrů ve zvoleném pořadí důležitosti nebo v některých rozměrech přes sebe – parametry zobrazení lze volit v dialogu viditelném na Obr. 2. Příklad zobrazení evokovaných potenciálů je na Obr. 3.



Obr. 2: Grafický modul s dialogem pro volbu zobrazení evokovaných potenciálů



Obr. 3: Grafický modul zobrazující evokované potenciály

Měření velikosti evokovaného potenciálu spočívá ve výběru jeho potřebné části a aplikaci funkcí max a min. Maxima a minima jsou uloženy do *.mat. Další funkce z nich pak spočítá rozdíly a vykreslí vstupně-výstupní křivku, kde na vodorovné ose je intenzita stimulu a na svislé ose je velikost odpovědi. Ta může být proložena například Boltzmannovou sigmoideou pomocí funkce nlinfit. Horizontální souřadnice inflexního bodu Boltzmannovy křivky byla zvolena jako měřítko citlivosti na stimulaci – vyšší hodnota značí nižší citlivost.

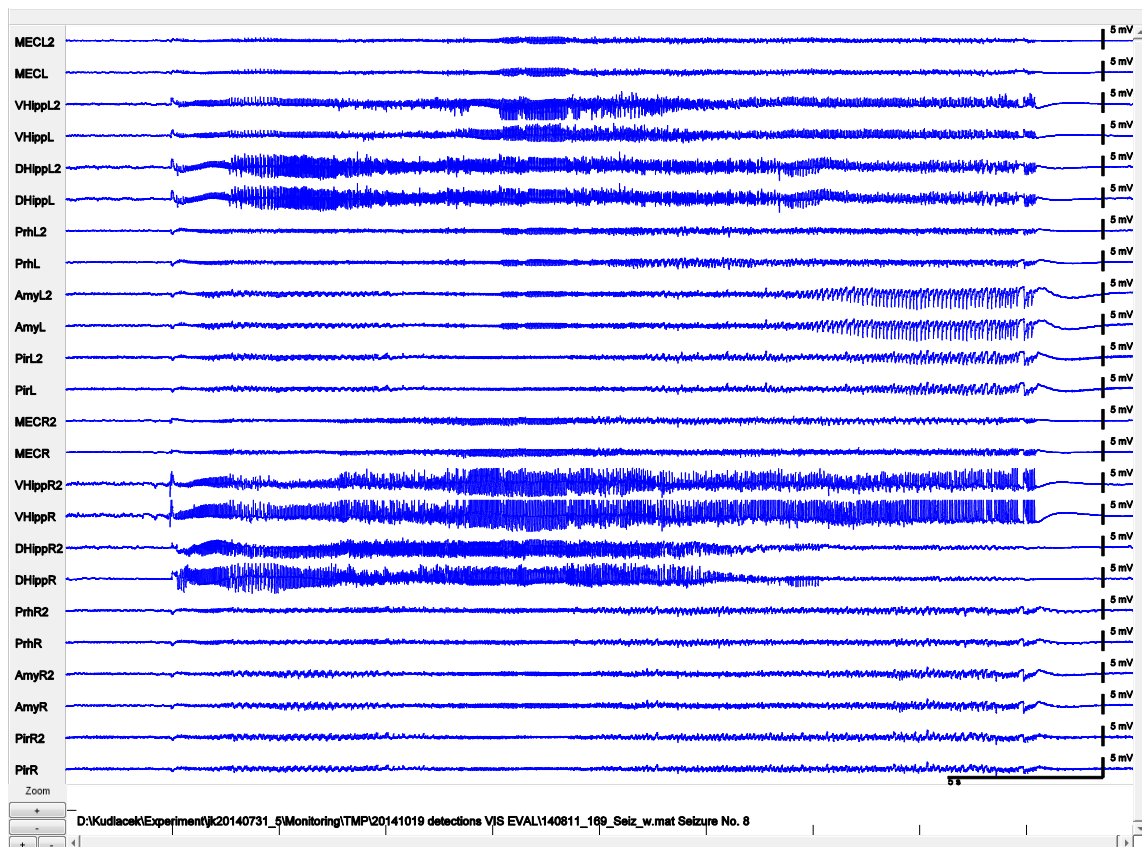
3 Výsledky

Pilotní výsledky prokazují užitečnost vytvořeného programu.

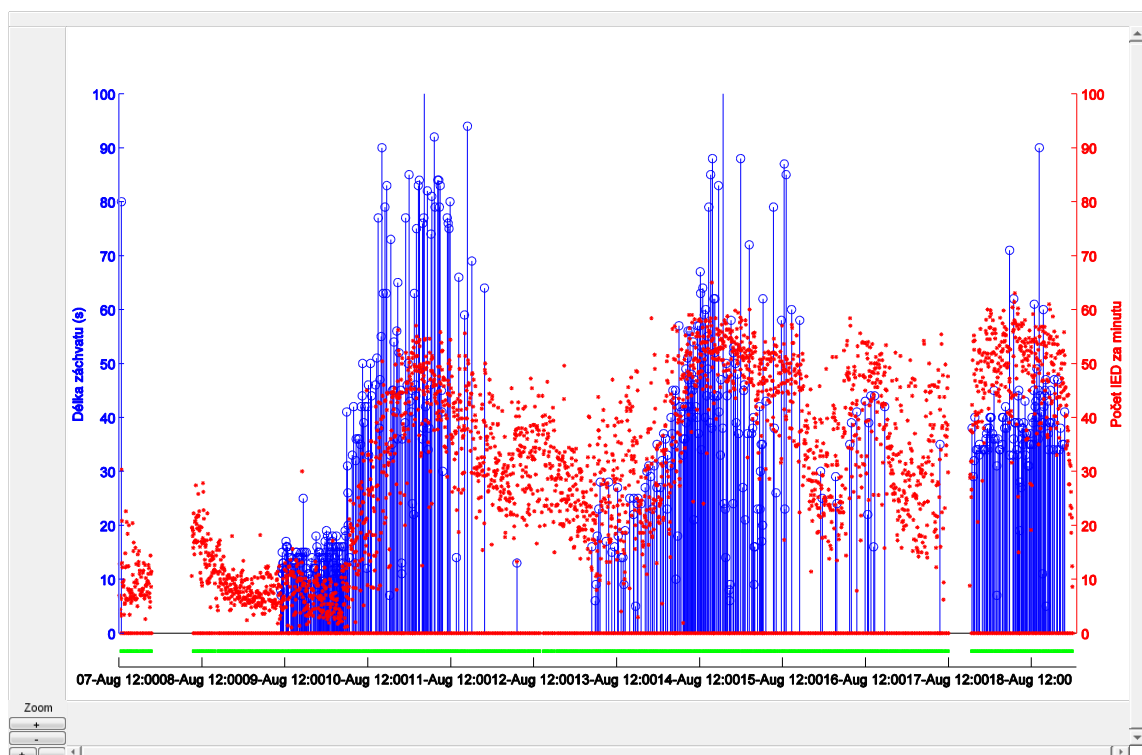
3.1 Dlouhodobý video/EEG monitoring

Při analýze 12 denního záznamu spontánní aktivity epileptického potkana bylo automatickým detektorem celkem detekováno 4421 záchvatů. Při vizuální kontrole bylo zjištěno, že většina detekcí byla falešných. Skutečných záchvatů délky nad 10 s bylo detekováno 487. Inter-iktálních výbojů (IED) bylo detekováno 44 tis. Detekce IED nebyly vizuálně ověřovány, jelikož detektor IED má nesrovnatelně lepší selektivitu, než detektor záchvatů. Navíc shlédnutí takového množství grafoelementů by trvalo neúnosně dlouho.

Záznam typického záchvatu je na Obr. 4. Délka zobrazeného záchvatu je půl minuty.



Obr. 4: Typický epileptický záchvat



Obr. 5: Dlouhodobá dynamika záchvatů a IED

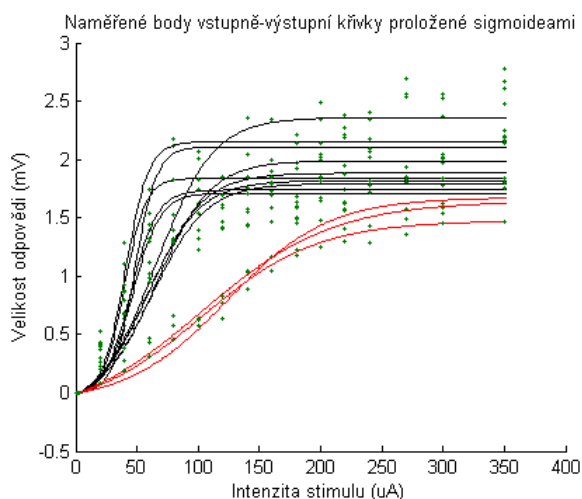
Dále byla vyhodnocena dlouhodobá dynamika záchvatů a interiktálních výbojů. V Obr. 5 jsou modře vyneseny délky záchvatů a červeně četnost IED v min^{-1} , získaná jako počty v 5 minutových

intervalech a normalizovaná na délku intervalu. Zelená linka v dolní části obrázku značí, že signál byl správně nahráván. Výpadky v nahrávání jsou zřetelné krátce po začátku a před koncem monitorovacího období.

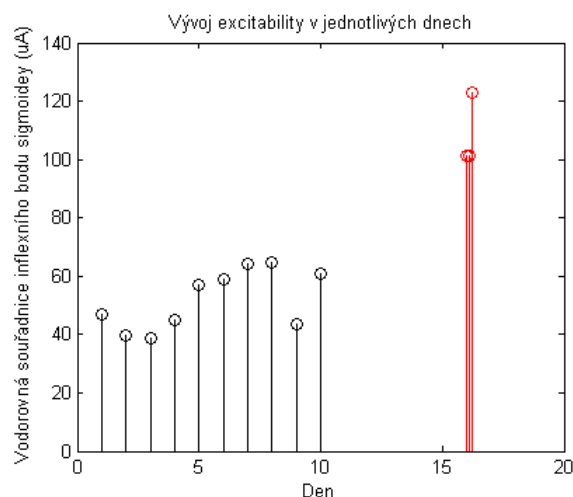
Je zřejmé, že záchvaty mají tendenci se v čase shlukovat. Shluk záchvatů trvá průměrně dva a půl dne. Dále je vidět, že záchvaty delší, než 40 s se objevují až po jednom dni od začátku shluku. Četnost IED se jeví do jisté míry korelovaná s délkami záchvatů.

3.2 Evokované potenciály

Postupem popsáním v odstavci 2.4.2 byly získány vstupně-výstupní křivky pro pravý dorzální hipokampus naměřené v jednotlivých dnech. Mezi 10. a 15. dnem vstupně-výstupní křivky měřeny nebyly, jelikož probíhala pravidelná stimulace každých 15 sekund. Na vstupně-výstupní křivce se pravidelná stimulace projevila jejím posunem doprava, což znamená že pro dosažení stejně velké odpovědi byla potřeba vyšší intenzita stimulu Obr. 6. Vodorovná souřadnice inflexního bodu proložené Boltzmannovy křivky, která byla zvolena jako jednočíselný parametr charakterizující polohu vstupně-výstupní křivky, je vynesena v Obr. 7.



Obr. 6: Vstupně-výstupní křivky z jednotlivých dnů naměřené v pravém dorzálním hipokampu proložené Boltzmannovými křivkami. Červeně křivky naměřeny po dlouhodobé pravidelné stimulaci.



Obr. 7: Vodorovné souřadnice inflexních bodů Boltzmannových křivek. Červeně data po dlouhodobé pravidelné stimulaci.

Snížení citlivosti vůči stimulaci může být způsobeno sníženou excitabilitou pravého dorzálního hipokampu. Druhou možností je snížení účinnosti stimulace například z důvodu zapouzdření stimulační elektrody do gliové jizvy. To by bylo zjistitelné pomocí měření impedance stimulační elektrody, které však bohužel provedeno nebylo.

4 Závěr

Byl vytvořen systém pro komplexní analýzu EEG signálů především pro účely epileptologického výzkumu. Systém využívá automatických detekcí a odečítání kvantifikativních parametrů a usnadňuje vizuální analýzu signálů. Užitečnost systému byla demonstrována na zpracování dat ze dvou pokusů.

V prvním pokusu byla studována dlouhodobá dynamika záchvatů a inter-iktálních výbojů v tetanotoxinovém modelu temporální epilepsie. Získaná data naznačují, že záchvaty se shlukují ve

shlucích dlouhých 2,5 dne. Dále data ukazují, že na začátku shluku mají tendenci se vyskytovat kratší záchvaty dlouhé do 40 s. Delší záchvaty se začínají objevovat cca 1 den po začátku shluku záchvatů.

Ve druhém pokusu bylo cílem zjistit vliv pravidelné dlouhodobé stimulace na vstupně-výstupní křivku. Vstupně-výstupní křivka byla měřena jednou denně po dobu 10 dní. Pak byl potkan 5 dní pravidelně stimulován každých 15 s. Po té byla vstupně-výstupní křivka opět 3 krát změřena. Naměřené vstupně-výstupní křivky byly proloženy Boltzmannovými sigmoideami. Horizontální souřadnice jejich inflexního bodu byla zvolena jako jednočíslné vyjádření citlivosti na stimulaci, přičemž vyšší číslo vyjadřuje nižší citlivost. Získaná data naznačují, že po dlouhodobé pravidelné stimulaci se citlivost na stimulaci snižuje.

5 Poděkování

Tato práce byla podpořena granty Ministerstva zdravotnictví České republiky (IGA NT/14489-3), Nadačního fondu Neuron (2012/10) a Grantové agentury České republiky (P303/14-02634S).

6 Literatura

- [1] QUERIOZ C. M., GORTER J. A., LOPES DA SILVA, F. H., WADMAN W. J. Dynamics of Evoked Local Field Potentials in the Hippocampus of Epileptic Rats With Spontaneous Seizures. *Journal of Neurophysiology*. 2008-10-08, vol. 101, issue 3, s. 1588-1597. DOI: 10.1152/jn.90770.2008.
- [2] sigTOOL Project. A MATLAB-based analysis environment for biological signal analysis. King's College London, 2011. <http://sigtool.sourceforge.net/sigtool.html>
- [3] ZACH L., Detekce epileptických záchvatů. Semestrální práce v předmětu A6M31BSG – Biologické signály na ČVUT FEL, 2012-05-17. Nепublikováno.
- [4] JANČA R., JEŽDÍK P., ČMEJLA R., TOMÁŠEK M., WORRELL G. A., STEAD M., WAGENAAR J., JEFFERYS J. G., KRŠEK P., KOMÁREK V., JIRUŠKA P., MARUSIČ P. Detection of Interictal Epileptiform Discharges Using Signal Envelope Distribution Modelling: Application to Epileptic and Non-Epileptic Intracranial Recordings. *Brain Topography*. 2014-6-27. DOI: 10.1007/s10548-014-0379-1.