

國立臺灣大學電機資訊學院生醫電子與資訊學研究所

碩士論文

Graduate Institute of Biomedical Electronics and Bioinformatics

College of Electrical Engineering and Computer Science

National Taiwan University

Master Thesis

以功能性磁振造影及腦電訊號觀察
超音波施於癲癇模型之神經調控效應

Focused Ultrasound Neuromodulation
Combined with Resting-State Functional MRI and
Electroencephalography to Investigate and
Intervene Drug-Induced Epilepsy Model

阮宜勁

Yi-Jing Juan

指導教授: 陳志宏 博士、劉浩澧 博士

Advisor: Jyh-Horng Chen, Ph.D., Hao-Li Liu, Ph.D.

中華民國 112 年 7 月

July 2023



致謝

在此謹向所有在完成本研究過程中給予支持和協助的每一位貴人，致以誠摯的感謝。

首先，感謝我的兩位指導教授-陳志宏教授與劉浩澧教授，感謝教授在每週的研究會議以及多次單獨討論中，不遺餘力地給予指導和支持。陳志宏老師不僅在專業領域上提供我寶貴的建議，同時老師也會不時分享之前在美國攻讀學位或在學校任職的重要經歷與心態，您的經驗與專業知識對我受益匪淺；劉浩澧老師提供跨領域的資源與業界的實務經驗，讓我能實驗架構建置期間能即時調整方向並使細節完善，同時也不吝與我討論諸多對於研究的想法與考量，使我能朝著研究目標持續前進，非常感謝老師的鼓勵與肯定。

再者，我要感謝陳右穎教授實驗室、葉秩光教授實驗室學長姊們的建議與協助，不論是在跨領域整合研究上多次的交流想法並彙整出能進步的面向，或是一同前往加拿大參加國際研討會時的互相照應，與您們合作過程中的每個小細節都讓我受益匪淺，這些經歷將伴隨著我進入未來的職業生涯。同樣，我也要感謝劉浩澧教授實驗室的博士後研究員-朱伯駿博士與黃琛璇博士，在動物實驗與機制探討的討論中，使我學習到諸多觀念與基礎，沒有您們的參與和貢獻，這項研究是無法實現的，每次的討論對本研究成果至關重要。

我也很慶幸能遇到兩位指導教授實驗室的學長姊、同學以及學弟妹們，感謝柏緯、虹誼、子毅、至新、柏翊、台安、偉豪、怡玢、豐育、柏廷、章佑、家

怡、旻儒、唯紘、仕鑫、正諺、天易、士瑜、敏宏、易佑、均懋、傳駿、晨沅、
欣晨、子澗、品如、丞峰、陶銘、承佑。



平時大家一同為各自的研究目標而努力，透過彼此闡述遇到的困難並相互討論，想法的交織有時會產生不同的思路，平時也會一起聚餐、運動、分享故事，緩解暫時的辛勞，再打起精神為下一週的研究進度而繼續努力；也要感謝助理們，君茹、姿郡、建今、宜錚、盈君與仁霈，在實驗室行政事務上的協助。我想即使我出社會，還是會記得這些珍貴的回憶。

最後我要感謝我親愛的家人以及摯友們，感謝你們兩年以來的關心和鼓勵，這些溫暖的舉動是我學習和成長的動力，我感到非常幸運有你們在我身邊。同時特別感謝陳志宏教授與子毅學長，在口試後的兩個禮拜內，每天不眠不休地和我進行論文的修改，萬分感激。總之，感謝所有在我研究過程中幫助過我的人，謝謝您們！



摘要

癲癇是一種神經系統疾病，其特點是不正常的神經放電。目前已有多種治療癲癇的方法，包括迷走神經刺激、深部腦刺激和反應性神經刺激。作為一種替代性神經調控療法，聚焦式超音波 (Focused Ultrasound, FUS) 被發現具有調控局部大腦興奮性的潛力，並且最近研究表明脈衝式 (burst-mode) 超音波刺激具有抑制癲癇的效果。在本研究中，我們嘗試使用靜息態功能性磁振造影 (resting-state functional MRI, rs-fMRI) 和腦電訊號 (Electroencephalography, EEG)，來研究藥物誘發癲癇的小動物模型中，聚焦式超音波脈動引起的抗癲癇效應的可行性。

本研究結果展示了在同一癲癇動物模型中，成功整合長期的 rs-fMRI 監測和 EEG 記錄，以評估藥物注射後誘發的癲癇信號。EEG 結果顯示，不正常放電所引起的尖波 (spike)，注射藥物後 10 分鐘內 spike 數量由 17.5 上升至 118.8，後續 60 分鐘內隨時間降低至 75.8；fMRI 結果顯示功能性連接相關係數 (Correlation Coefficient, C.C.) 由 0.19 上升至 0.65，後續 60 分鐘內隨時間降低至 0.29。該模型也可觀察 FUS 對癲癇的抑制效果，在 10 分鐘的 FUS 施打後，最高可抑制 52.9% 的 spike 數量；超音波誘導的神經調控引起了腦區與腦區間的功能性連結的變化，rs-fMRI 結果顯示在 FUS 施打後，巴貝茲迴路 (Papez circuit) 相關腦區，功能性連結 C.C. 相較於僅有藥物誘發癲癇，最高下降了 61.8%，使原本興奮的腦區趨於靜息態。藥物誘發癲癇可從功能性連結觀察到全腦興奮的現象，而聚焦式超音波誘發的神經調控使得腦區與腦區間的功能性連結發生變化，分析結果在癲癇模型中 EEG 的 spike 與 fMRI 的 C.C. 呈現高度相關性，根據本研究可得出全腦 C.C. 平均數高於 0.36 代表腦呈現癲癇狀態，而 FUS 治療後 C.C. 若低於 0.31 代表癲癇已一定程度被抑制。

綜上所述，本研究建置的模型可藉由 rs-fMRI 和 EEG 探究藥物誘發癲癇的生理訊號改變，也可觀察超音波施於癲癇模型的神經調控效應。然而，為了理解利用超音波干預癲癇的機制與背後的聯繫，對於 FUS 參數的優化、施打腦區的選擇、以及未來可用蛋白染色探討 FUS 神經調控機制等，尚需更多研究與實驗。

關鍵字：功能性磁振造影、腦電訊號、聚焦式超音波、癲癇、神經調控



Abstract

Epilepsy is a neurological disorder characterized by abnormal neuronal discharges. A number of modalities have been developed to interfere with epilepsy, including vagus nerve stimulation, deep brain stimulation, and responsive neurostimulation. As an alternative neuromodulation therapy, focused ultrasound (FUS) has been found to have the potential to modulate regional brain excitability, and recently burst-mode ultrasound stimulation has been shown to have an epileptic suppressing effect. In this study, we investigate the feasibility of utilizing resting-state functional MRI(rs-fMRI) and Electroencephalography(EEG) to investigate the anti-epileptic effect induced by focused ultrasound pulsations in a drug-induced epileptic small-animal model.

The results of this study demonstrate the successful integration of longitudinal rs-fMRI monitoring and EEG recordings in the same epilepsy animal model to assess drug-induced epileptic signals. The EEG results showed that the number of spikes caused by abnormal discharges increased from 17.5 to 118.8 within 10 minutes after drug injection and then decreased to 75.8 within the following 60 minutes. The fMRI results showed that the functional connectivity correlation coefficient (C.C.) increased from 0.19 to 0.65 within 10 minutes after drug injection and then decreased to 0.29 within the following 60 minutes. The model also observed the inhibitory effect of FUS on epilepsy, with a maximum suppression of 52.9% of spike numbers after 10 minutes FUS. FUS-induced neuromodulation resulted in changes in brain region-to-region functional connectivity. The rs-fMRI results showed that after FUS, the C.C. of the Papez circuit-related brain regions decreased by up to 61.8% compared to drug-induced epilepsy alone, indicating a shift towards a resting state in originally excitable brain regions. Drug-induced epilepsy

was observed in functional connectivity as increased brain excitability, while FUS-induced neuromodulation led to changes in brain region-to-region functional connectivity. The analysis showed a high correlation between EEG spikes and fMRI C.C. in the epilepsy model, and based on this study, a C.C. average higher than 0.36 indicated an epileptic state, while a C.C. lower than 0.31 after FUS treatment suggested epilepsy suppression.

In summary, the model established in this study can be utilized to explore the biosignal changes caused by drug-induced epilepsy using rs-fMRI and EEG and observe the neuromodulation effects of FUS in the epilepsy model. However, to better understand the mechanism and underlying connections of using FUS intervention for epilepsy, further research and experiments are required to optimize FUS parameters, determine optimal stimulation site, and explore FUS neuromodulation mechanisms using protein staining.

Keywords: Functional MRI, Electroencephalography, Focused Ultrasound, Epilepsy, Neuromodulation



目錄

	Page
致謝	i
摘要	iii
Abstract	iv
圖目錄	ix
表目錄	xiv
第一章 緒論	1
1.1 癲癇疾病現況	1
1.2 癲癇治療方法	5
1.3 聚焦式超音波治療癲癇	6
1.3.1 聚焦式超音波	8
1.3.2 超音波神經調控治療癲癇	9
1.4 評估治療效果：功能性磁振造影與腦電訊號	13
1.4.1 功能性磁振造影	13
1.4.2 腦電訊號	16
1.5 研究目的與貢獻	19
第二章 方法與理論	20
2.1 實驗架構	20



2.2	動物模型準備	22
2.2.1	癲癇藥物	22
2.2.2	麻醉藥物	22
2.2.3	電極植入手術	24
2.3	聚焦式超音波刺激系統	30
2.3.1	硬體配置	30
2.3.2	聲場量測與強度換算	30
2.3.3	刺激參數	31
2.4	EEG 量測實驗	34
2.5	MRI 掃瞄實驗	37
2.6	資料分析	39
2.6.1	fMRI 資料後處理	39
2.6.2	EEG 資料後處理	44
2.7	統計分析	45
第三章	實驗結果	46
3.1	藥物誘發癲癇動物 EEG 結果	46
3.2	超音波治療後藥物誘發癲癇動物 EEG 結果	48
3.3	藥物誘發癲癇動物 fMRI 結果	49
3.4	超音波治療後藥物誘發癲癇動物 fMRI 結果	58
3.5	統計分析結果	66
3.5.1	EEG 組分析結果	66
3.5.2	fMRI 組分析結果	69

第四章	討論	75
4.1	神經調控抑制癲癇文獻比較	75
4.2	超音波抑制癲癇文獻比較	76
4.3	神經調控刺激視丘文獻比較	78
4.4	fMRI 功能性連結探討癲癇	79
4.5	研究限制與優勢	83
第五章	結論與未來展望	86
5.1	結論	86
5.2	未來展望	88
5.2.1	機轉探討	88
5.2.2	封閉迴路超音波控制系統	91
	參考文獻	93





圖目錄

圖 1.1	神經調控方法	7
圖 2.1	本研究之實驗架構	20
圖 2.2	MR 相容白金電極，可植入長度 14.9mm，其中前 2.25mm 為記錄 EEG 訊號的 16 channels [1]	25
圖 2.3	規劃電極植入位置，以斜插方式植入在海馬迴 CA1	27
圖 2.4	規劃超音波施打位置，焦點涵蓋視丘 CM 與視丘前核 IAM	28
圖 2.5	電極植入手術流程	29
圖 2.6	經 MRI T2 結構影像確認電極成功植入至目標腦區海馬迴	29
圖 2.7	聲場量測設置與量測結果	32
圖 2.8	Mechanical Index 換算	33
圖 2.9	FUS 參數說明	33
圖 2.10	EEG 量測系統	34
圖 2.11	量測 EEG 環境與動物架設情形	35
圖 2.12	EEG 分組實驗流程	36
圖 2.13	MRI 量測系統	38
圖 2.14	fMRI 分組實驗流程	38
圖 2.15	fMRI 資料分析，使用 SPM 前處理與 Restplus 後處理	41
圖 2.16	fMRI 資料後處理，提取 36 個腦區 (左右腦各 18 個) 的 BOLD 訊號得出功能性連結矩陣 [2]	43
圖 2.17	fMRI 功能性連結矩陣各腦區與網路說明 [2]	43
圖 2.18	EEG 資料後處理，spike 數量累計	44
圖 3.1	比較 Normal 組動物的 EEG，注射 PTZ 誘發癲癇的動物，在 EEG 上有尖波數量增加的趨勢	47

圖 3.2	注射 4 種不同劑量的 PTZ 誘發癲癇，每種劑量所對應 EEG 的尖波數量。劑量 70mg/kg 在 60 分鐘內可維持相對較高的尖波數量，故將其作為後續實驗的使用劑量	47
圖 3.3	超音波治療癲癇動物 EEG 結果。對比只注射癲癇藥物的 PTZ(+)/FUS(-) 組，PTZ(+)/FUS(+) 組在 FUS 施打後，spike 的數量有減少的趨勢	48
圖 3.4	PTZ(+)/FUS(+) 組中兩隻動物的 EEG 尖波數量隨時間變化表，尖波數量每兩分鐘進行一次累計。對比只注射癲癇藥物的組別(黑線)，超音波治療組別(紅線)的尖波數量明顯下降	49
圖 3.5	fMRI 實驗 Normal 組與 PTZ(+)/FUS(-) 組動物實驗結果。(a) 在注射 PTZ 後，在皮層、右側海馬迴、視丘等腦區，訊號強度皆有顯著上升(呈現紅白色)。(b) 在注射 PTZ 後，顏色由偏青藍色變成偏棕紅色，代表大部分腦區與腦區間的功能性連結有上升趨勢	50
圖 3.6	fMRI 實驗 Normal 組的 4 隻動物的 FC 矩陣。可觀察 4 隻動物在 60 分鐘內的矩陣皆為青藍色，代表功能性連結改變不大，但每隻動物會有個體差異	51
圖 3.7	fMRI 實驗 PTZ(+)/FUS(-) 組 6 隻動物的 FC 矩陣。在注射 PTZ 之後，顏色由青藍色變成棕紅色，代表腦區與腦區間的功能性連結 C.C.，數值皆有上升趨勢	52
圖 3.8	fMRI 實驗 PTZ(+)/FUS(-) 組動物實驗結果 C.C. 分布 Histogram。對比藥物注射前的 C.C. 平均值 0.19，注射後 10 分鐘平均值上升至 0.65，隨時間下降至注射後 60 分鐘的 0.28	53
圖 3.9	fMRI 實驗 PTZ(+)/FUS(-) 組動物實驗結果，PTZ 注射前 FC 矩陣與 C.C. 分布 Histogram，C.C. 平均值為 0.19	54
圖 3.10	fMRI 實驗 PTZ(+)/FUS(-) 組動物實驗結果，PTZ 注射後 10 分鐘 FC 矩陣與 C.C. 分布 Histogram，C.C. 平均值為 0.65	54
圖 3.11	fMRI 實驗 PTZ(+)/FUS(-) 組動物實驗結果，PTZ 注射後 20 分鐘 FC 矩陣與 C.C. 分布 Histogram，C.C. 平均值為 0.54	55
圖 3.12	fMRI 實驗 PTZ(+)/FUS(-) 組動物實驗結果，PTZ 注射後 30 分鐘 FC 矩陣與 C.C. 分布 Histogram，C.C. 平均值為 0.51	55

圖 3.13	fMRI 實驗 PTZ(+)/FUS(-) 組動物實驗結果，PTZ 注射後 40 分鐘 FC 矩陣與 C.C. 分布 Histogram，C.C. 平均值為 0.43	56
圖 3.14	fMRI 實驗 PTZ(+)/FUS(-) 組動物實驗結果，PTZ 注射後 50 分鐘 FC 矩陣與 C.C. 分布 Histogram，C.C. 平均值為 0.32	56
圖 3.15	fMRI 實驗 PTZ(+)/FUS(-) 組動物實驗結果，PTZ 注射後 60 分鐘 FC 矩陣與 C.C. 分布 Histogram，C.C. 平均值為 0.28	57
圖 3.16	本研究中 PTZ(+)/FUS(-) 組 EEG spike 與 C.C. 隨時間變化之比較。在時間點 0min 注射 PTZ 之後，EEG spike 數量的上升 (由 17.5 上升至 111.8)，對比腦區與腦區之間功能性連結變化呈現類似的趨勢 (C.C. 由上升 0.24 至 0.58)，皆在注射後 10 分鐘有顯著提升，之後隨著時間慢慢降低	58
圖 3.17	fMRI 實驗 PTZ(+)/FUS(-) 組與 PTZ(+)/FUS(+) 組動物實驗結果。 (a) 在注射 PTZ 後的前 10 分鐘，在皮質、右側海馬迴與部分視丘的腦區，訊號強度皆有顯著上升，在 FUS 介入後，各腦區訊號強度明顯下降。(b) 在注射 PTZ 後的前 10 分鐘，顏色由藍色轉變為黃綠色與棕紅色，代表腦區與腦區間的功能性連結數值有上升趨勢，在 FUS 介入後，各腦區的功能性連結下降至接近 baseline	60
圖 3.18	fMRI 實驗 PTZ(+)/FUS(+) 組 6 隻動物的 FC 矩陣。在注射 PTZ 後 10 分鐘內，矩陣顏色由青藍色變成棕紅色，代表腦區與腦區間的功能性連結，數值皆有上升趨勢，在 FUS 介入後，矩陣顏色轉為青藍色，代表各腦區的功能性連結皆下降至接近 baseline	61
圖 3.19	fMRI 實驗 PTZ(+)/FUS(+) 組動物 fMRI 結果 C.C. 分布 Histogram。對比藥物注射前的 C.C. 平均值 0.17，注射後 10 分鐘平均值上升至 0.63，FUS 介入後平均值下降至 0.23，40 分鐘內平均值最高為 0.31	62
圖 3.20	fMRI 實驗 PTZ(+)/FUS(+) 組動物實驗結果，PTZ 注射前 FC 矩陣與 C.C. 分布 Histogram，平均值為 0.17	62
圖 3.21	fMRI 實驗 PTZ(+)/FUS(+) 組動物實驗結果，PTZ 注射後 10 分鐘 FC 矩陣與 C.C. 分布 Histogram，平均值為 0.63	63

圖 3.22	fMRI 實驗 PTZ(+)/FUS(+) 組動物實驗結果，FUS 施打後 10 分鐘 FC 矩陣與 C.C. 分布 Histogram，平均值為 0.23	63
圖 3.23	fMRI 實驗 PTZ(+)/FUS(+) 組動物實驗結果，FUS 施打後 20 分鐘 FC 矩陣與 C.C. 分布 Histogram，平均值為 0.31	63
圖 3.24	fMRI 實驗 PTZ(+)/FUS(+) 組動物實驗結果，FUS 施打後 30 分鐘 FC 矩陣與 C.C. 分布 Histogram，平均值為 0.26	64
圖 3.25	fMRI 實驗 PTZ(+)/FUS(+) 組動物實驗結果，FUS 施打後 40 分鐘 FC 矩陣與 C.C. 分布 Histogram，平均值為 0.29	64
圖 3.26	本研究中 PTZ(+)/FUS(+) 組 EEG spike 與 C.C. 隨時間變化之比較。在時間點 0min 注射 PTZ 之後，EEG spike 數量的上升 (由 17.2 上升至 109.8)，對比腦區與腦區之間功能性連結變化呈現類似的趨勢 (C.C. 由上升 0.23 至 0.57)，皆在注射後 10 分鐘有顯著提升；在 FUS 介入治療後，EEG spike 數量下降 (由 109.8 下降至 47.4)，C.C 平均數值也下降 (由 0.57 下降至 0.25)，呈現癲癇被抑制的結果 . . .	65
圖 3.27	EEG 實驗 PTZ(+)/FUS(+) 組的 8 隻動物，分別在只注射 PTZ(黑線) 與注射 PTZ 後施打 FUS(紅線) 情形的 spike 數量，每 2 分鐘做一次累計	67
圖 3.28	EEG 實驗 T-test 統計分析結果，對比 Normal 組 (灰線)，注射 PTZ 後的 spike 數量明顯上升 (由 17.5 上升至 111.8)；比較 PTZ(+)/FUS(-) 組 (黑線) 與 PTZ(+)/FUS(+) 組 (紅線)，在 FUS 介入後 spike 數量減少 35.8% - 52.9%。* 代表 Normal 組與 PTZ(+)/FUS(-) 組的顯著性差異，* P<0.05, ** P<0.01；# 代表 PTZ(+)/FUS(-) 組與 PTZ(+)/FUS(+) 組的顯著性差異，# P<0.05, ### P<0.01	68
圖 3.29	fMRI 實驗 T-test：海馬迴與視丘的功能性連結 C.C. 結果，對比 Normal 組 (藍色柱)，注射 PTZ 後的 C.C. 明顯上升 (由 0.258 上升至 0.580)；比較 PTZ(+)/FUS(-) 組 (綠色柱) 與 PTZ(+)/FUS(+) 組 (紅色柱)，在 FUS 介入後 C.C. 減少 11.4% - 45.1%。* 代表 Normal 組與 PTZ(+)/FUS(-) 組的顯著性差異，* P<0.05, ** P<0.01；# 代表 PTZ(+)/FUS(-) 組與 PTZ(+)/FUS(+) 組的顯著性差異，# P<0.05, ### P<0.01	70



圖 3.30 fMRI 實驗 T-test：海馬迴與視丘腹後內/外側核的功能性連結
 C.C. 結果，對比 Normal 組 (藍色柱)，注射 PTZ 後的 C.C. 明顯上升
 (由 0.179 上升至 0.533)；比較 PTZ(+)/FUS(-) 組 (綠色柱) 與 PTZ(+)/
 FUS(+) 組 (紅色柱)，在 FUS 介入後 C.C. 減少 15.2% - 52.3%。* 代表
 Normal 組與 PTZ(+)/FUS(-) 組的顯著性差異，* P<0.05, ** P<0.01；#
 代表 PTZ(+)/FUS(-) 組與 PTZ(+)/FUS(+) 組的顯著性差異，# P<0.05,
 ## P<0.01 72

圖 3.31 fMRI 實驗 T-test：視丘與視丘腹後內/外側核的功能性連結
 C.C. 結果，對比 Normal 組 (藍色柱)，注射 PTZ 後的 C.C. 明顯上升
 (由 0.121 上升至 0.609)；比較 PTZ(+)/FUS(-) 組 (綠色柱) 與 PTZ(+)/
 FUS(+) 組 (紅色柱)，在 FUS 介入後 C.C. 減少 36.6% - 61.8%。* 代表
 Normal 組與 PTZ(+)/FUS(-) 組的顯著性差異，* P<0.05, ** P<0.01；#
 代表 PTZ(+)/FUS(-) 組與 PTZ(+)/FUS(+) 組的顯著性差異，# P<0.05,
 ## P<0.01 74

圖 4.1 過往研究探討顳葉癲癇的功能性連結，顳葉癲癇病患的海馬迴，
 與顳葉、島葉、視丘、額葉、基底節、腦幹和小腦等腦區的功能性
 連結增加，可從腦區與腦區間的功能性連結觀察癲癇病患與正常人
 腦的差異 [3] 80

圖 4.2 本研究中 PTZ(+)/FUS(-) 組 EEG spike 與 C.C. 隨時間變化之散布
 圖與相關性 81

圖 4.3 本研究中 PTZ(+)/FUS(+) 組 EEG spike 與 C.C. 隨時間變化之散布
 圖與相關性 82

圖 5.1 FUS 打開血腦屏障的迴授控制系統示意圖，由被動空化偵測與
 迴授控制演算法等技術組成 FUS BBB opening 的迴授控制系統 [4] . 91



表目錄

表 2.1	實驗動物分組	21
表 2.2	常見的誘發癲癇藥物	22
表 2.3	PTZ 與麻醉藥物機制與管制等級	23
表 2.4	常見麻醉藥物與使用特性	24
表 2.5	本研究 FUS 神經調控參數	31
表 3.1	EEG 實驗 T-test 統計分析 spike 數量與 p value	68
表 3.2	fMRI 實驗 T-test 統計分析：海馬迴與視丘的 C.C. 與 p value	70
表 3.3	fMRI 實驗 T-test 統計分析：海馬迴與視丘腹後內/外側核的 C.C. 與 p value	72
表 3.4	fMRI 實驗 T-test 統計分析：視丘與視丘腹後內/外側核的 C.C. 與 p value	74
表 4.1	神經調控抑制癲癇文獻比較，數據顯示本研究抑制成果與常見神 經調控相似	76
表 4.2	超音波抑制癲癇文獻，針對不同超音波參數、施打腦區與 spike 抑制情形做比較	77



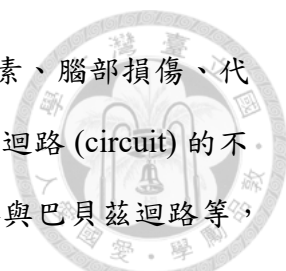
第一章 緒論

1.1 癲癇疾病現況

癲癇 (Epilepsy) 是一種常見的神經系統疾病，其特徵是發作性的腦部神經細胞過度興奮導致的不正常放電，表現為過度興奮且同步性的神經活動，癲癇發作可以導致不同程度的意識喪失、肌肉痙攣、感覺異常，以及其他神經系統相關的症狀 [5] [6]。癲癇的影響非常廣泛，它可能影響任何年齡段的人，但它在兒童和老年人中較為常見。癲癇的成因尚未明確，可能是來自腦部損傷或參與神經活動的遺傳因素 [7]。目前全球有超過 5,000 萬人受到癲癇的影響 [8]，每年統計的發病率為每 10 萬人中約有 50 人被診斷為癲癇 [9]。發展中國家的發病率比已開發國家還高 [8] [9]。

癲癇發作類型可分為部分性癲癇發作以及全面性癲癇發作 [10]。部分性癲癇發作僅涉及大腦的一個特定區域，例如顳葉癲癇 (Temporal Lobe Epilepsy, TLE)、額葉癲癇 (Frontal Lobe Epilepsy, FLE)、枕葉癲癇 (Occipital Lobe Epilepsy, OLE) 與頂葉癲癇 (Parietal Lobe Epilepsy, PLE)，症狀有包括痙攣、感覺異常或意識喪失。全面性癲癇發作 (Generalized Epilepsy) 會使大腦呈現全腦過度興奮的狀態，會導致全身性的肌肉痙攣和意識喪失 [6]。

全面性癲癇的特點是涉及整個大腦，從發作一開始就引起全身性的過度興奮。這意味著在發作時，大腦的多個部分同步受到影響，從而導致全身性的癲癇

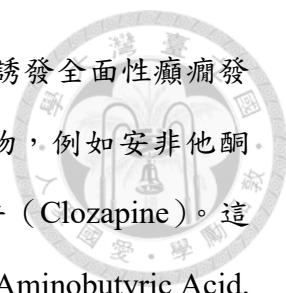


發作。全面性癲癇可以發生在任何年齡段，病因可能與遺傳因素、腦部損傷、代謝問題或是其他腦部異常 [11] 有關。全面性癲癇也會引發腦內迴路 (circuit) 的不正常放電，包含內顳葉迴路、皮層基底核迴路、點狀結構迴路與巴貝茲迴路等，其中巴貝茲迴路 (Papez circuit) 在腦功能的記憶形成、情緒調節、學習等方面扮演重要角色，迴路包含海馬迴 (Hippocampus, Hippo.)、杏仁核 (Amygdala)、視丘 (Thalamus, Thal.)、視丘前核 (Anterior Nucleus of Thalamus, ANT) 與腦區間的連接軸突纖維束 [12]。

海馬迴是巴貝茲迴路的一部分，巴貝茲迴路最終構成了邊緣系統的一部分。海馬迴活動性增加，會通過巴貝茲迴路輸出到邊緣系統的其他部分，接著再以放大的輸入返回到海馬迴，這可能導致全面性癲癇發作。儘管影像學研究揭示了帕佩茲迴路的傳入和傳出途徑的異常，但目前並沒有確鑿的證據表明巴貝茲迴路與癲癇發作的因果關係。相比之下，興奮性和抑制性的神經細胞受體及其作用得到了許多研究的支持 [13]。

巴貝茲迴路中，ANT 和 Hippo. 之間有特別強的聯繫，表現為這些區域之間的腦波有著高度相關性，意即產生規則震盪的神經元的同步放電。巴貝茲迴路是治療癲癇的一個有吸引力的目標，因為迴路上的神經調控可以影響海馬和皮質區域，從而打斷病理信號和癲癇傳播，其中巴貝茲迴路中的兩個腦區，即海馬迴與 ANT，它們是神經調控的兩個主要目標腦區 [14]。

全面性癲癇包括多種不同的類型，常見的類型包括肌陣攣發作 (Myoclonic Seizures)、強直陣攣發作 (Tonic-Clonic Seizures) 與癲癇性失神 (Absence Seizures)。肌陣攣發作的特點是短暫的肌肉抽搐或震顫，這些抽搐可能在一個或多個肌肉群中同時出現；強直陣攣發作又被稱為大癲癇發作，其特點是肌肉的張攣和跳動，且伴隨意識喪失，在發作期間，患者可能會倒地，肌肉會持續痙攣，有時可能咬到舌頭或尿失禁；癲癇性失神特點是短暫的意識喪失，患者在發作期間會出現凝視或停頓，且發作時通常不會發出聲音或做其他動作。




除了自然形成的全面性癲癇，一些藥物和藥物濫用也可能誘發全面性癲癇發作，這些藥物稱為藥物誘發性癲癇 (Drug-Induced Epilepsy) 藥物，例如安非他酮 (Bupropion)、曲馬多 (Tramadol)、異煙肼 (Isoniazid)、氯氮平 (Clozapine)。這四種藥物的作用機制，都與神經傳導物質 γ -氨基丁酸 (Gamma-Aminobutyric Acid, GABA) 有關。

GABA 作為神經傳導物質，它在中央神經系統中發揮重要作用。GABA 是一種抑制性神經傳導物質，它在大腦中負責抑制神經元的活動，幫助調節和平衡神經傳導，以確保神經功能正常。GABA 的主要功能和特點有抑制神經元活動、鎮靜效果，以及抗癲癇作用等。GABA 通過作用於大腦中的特定受體 (GABA receptor)，減少神經元的興奮性，阻止神經元的過度活動。這使得 GABA 在調節神經元之間的信號傳導中具有重要作用，有助於維持神經系統的穩定性，它有助於減輕焦慮和壓力；再者，作為一種抑制性神經傳導物質，GABA 對於防止神經元過度興奮、控制癲癇的發生和發作非常重要，抗癲癇藥物例如苯二氮平類藥物 (Benzodiazepines) 與巴比妥類藥物 (Barbiturates)，都是通過增加 GABA 的效果或增加 GABA 在神經元之間的濃度，來達到抑制癲癇的作用。

總之，GABA 在中樞神經系統中扮演著關鍵的角色，它是一種重要的抑制性神經傳導物質，通過抑制神經元的興奮性來調節和平衡神經系統的功能。醫學上 GABA 和與其相關的受體對於治療癲癇、焦慮和睡眠問題等疾病，扮演關鍵角色。

提到常見的誘發癲癇藥物，Bupropion 是一種抗抑鬱藥物和戒煙藥物，降低抑制神經傳導物質去甲腎上腺素與多巴胺的再吸收，增加這些神經遞質在大腦中的濃度。這種增加可能導致神經元過度興奮，導致癲癇發作，並影響其他神經傳導物質，例如 GABA 和葉酸，搭配高劑量的 Bupropion 也可能誘發癲癇發作；Tramadol 是一種鎮痛藥，作用機制與鴉片類藥物相似，作用於大腦中的鴉片類受體，可能抑制 GABA 等抑制性神經傳導物質的釋放，同時促進興奮性神經傳導物



質的釋放，這可能導致神經元過度興奮，增加癲癇發作的風險，特別是在高劑量或與其他藥物同時使用時更為明顯；Isoniazid 是一種用於結核病治療的藥物，可能干擾 GABA 的合成，這是一種抑制性神經傳導物質，它在大腦中有舒緩神經元活動的作用，因此，Isoniazid 的使用可能導致神經元過度興奮，增加癲癇發作的風險，尤其是在有癲癇病史的患者中更需要多加注意藥物使用；Clozapine 是一種用於治療嚴重精神疾病的藥物，例如精神分裂症，可能干擾 GABA 等抑制性神經傳導物質的釋放，這導致興奮性神經傳導物質的過度釋放，這樣的神經元過度興奮可能導致癲癇發作。

對於診斷癲癇，通常會使用腦部影像學技術，例如磁振造影和腦電訊號，以檢測腦部的結構和電活動變化。癲癇發作時伴隨的特徵包括發作期和發作間期的腦電訊號異常，也會伴隨行為功能障礙和海馬迴硬化 [15]。因此，癲癇治療有非常重要的臨床需求，也是國內外醫療研究機構的主要目標。



1.2 癲癇治療方法

抗癲癇藥物是癲癇治療的基石，儘管已經研發了超過 20 種用於治療癲癇的藥物，但超過三分之一的癲癇患者對任何藥物都無反應，這種情況被稱為藥物耐受性癲癇 (Drug-resistant epilepsy, DRE) [16]，大約有 20-40% 的癲癇患者患有藥物耐受性癲癇。治療藥物耐受性癲癇的選項包括手術切除或神經調節，對於具有局部或區域性起源的藥物耐受性癲癇患者，可以通過手術來切除癲癇病灶的區域 [17]，但並非所有患者都適合手術，因為不是每一個患者都能在腦部醫學影像中找到病灶所在，且手術可能有感染風險，可能引起嚴重不良事件 [18]。對於這些患者，腦神經調控 (Neuromodulation) 是一種替代療法，可以減少癲癇不正常放電的發生率。

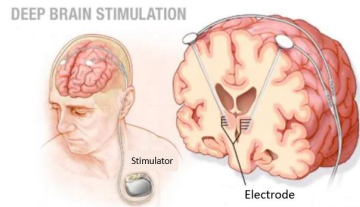
已經評估了多種侵入性 (invasive) 與非侵入性 (non-invasive) 腦神經調控工具用於治療癲癇，如圖 1.1。美國食品和藥物管理局 (United States Food and Drug Administration, FDA) 已批准了基於深部腦刺激 (Deep Brain Stimulation, DBS) 圖 1.1(a)、迷走神經刺激 (Vagus Nerve Stimulation, VNS) 圖 1.1(b)、和反應性神經刺激 (Responsive Neurostimulation, RNS) 圖 1.1(c) 等神經調控設備來緩解癲癇症狀的療法 [19]。其中 DBS 透過巴貝茲迴路 ANT 治療癲癇，該技術於 2018 年獲得 FDA 批准；Vlis 等人的研究中，通過刺激巴貝茲迴路的視丘前核來干預病理電活動、減少神經元損失、抑制免疫反應或調控神經元能量代謝，來遠程調控神經元網路興奮性，結果顯示在病灶處海馬迴，癲癇發作頻率降低 29% [20]。

DBS、VNS、RNS 雖然有緩解癲癇症狀的成效，但也稍具侵入性。其他使用經顱磁刺激 (Transcranial Magnetic Stimulation, TMS) 和經顱直流刺激 (Transcranial Direct Current Stimulation, tDCS) 的設備提供非侵入性腦部刺激，如圖 1.1(d) 與圖 1.1(e)，但各有其技術限制，TMS 的一個主要限制是誘導場強度的迅速降低，它不允許在皮質下刺激進行高效的能量輸送 [21]；tDCS 通過電極貼片向大腦輸送微

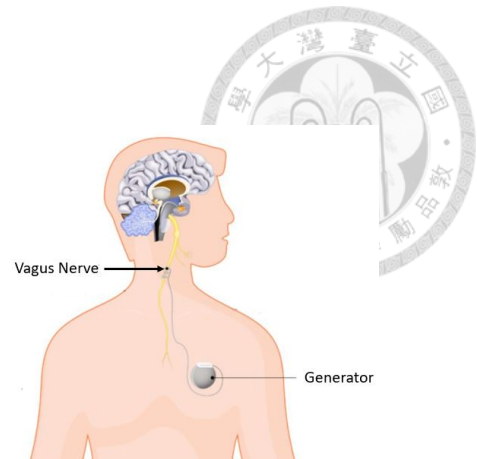
弱的直流電，其空間解析度受到頭骨散射的影響，並且有效的穿透距離較短，難以集中於深層腦區或特定目標 [22]。兼具非侵入性並準確作用於深腦區域等優勢，聚焦式超音波（Focused Ultrasound, FUS）作為治療癲癇的新療法，如圖 1.1(f)，在近年來被熱烈地研究與討論 [23]。

1.3 聚焦式超音波治療癲癇

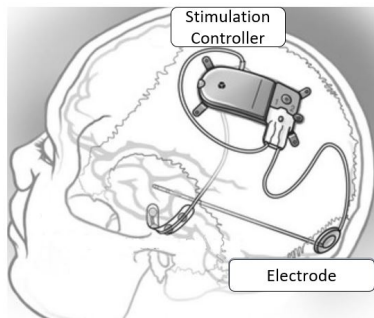
聚焦式超音波是一種利用超音波技術來聚焦和傳遞能量到特定區域的方法，它可以將能量準確且非侵入性地聚焦在深部腦組織中。低強度聚焦式超音波 (low intensity focused ultrasound, LIFU) 的空間解析度精確到毫米的等級，穿透距離超過 10 公分，可以通過完整的頭骨對腦組織進行標靶治療。多項研究已經證明 FUS 可以在動物模型中調控腦神經活動，並且可以暫時操縱鈉離子通道或鈣離子通道 [24]；近年研究顯示，經顱超音波刺激對慢性癲癇具有神經保護的潛力，該刺激在癲癇發作開始時可以抑制癲癇型腦電訊號活動 [25]；FUS 直接刺激神經元的動作電位和突觸傳遞，可以降低人類運動皮層的興奮性，FUS 的神經元調控特性，尤其是抑制神經元興奮性的能力，可以抑制癲癇發作期間神經元的過度活動，故 FUS 具有成為癲癇的可行治療方法的潛力。Min [26] 以前曾在特定參數下以腦電訊號證明了 FUS 在藥物誘發急性癲癇的模型中，對癲癇發作的抑制效果。然而，對於 FUS 治療癲癇的超音波條件，尚未確定該應用的最佳超音波參數選擇，也尚未進行更多研究以闡明超音波刺激對癲癇的抑制效應的可能生理機制。在將 FUS 作為癲癇臨床治療的探索之前，對 FUS 刺激的神經保護和長期行為效應進行確認，在科研將會是有益的。



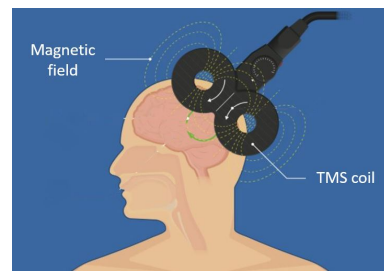
(a) 深部腦刺激 DBS [19]



(b) 迷走神經刺激 VNS [19]



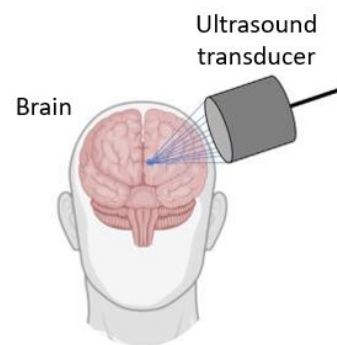
(c) 反應性神經刺激 RNS [19]



(d) 經顱磁刺激 TMS [21]



(e) 經顱直流刺激 tDCS [22]



(f) 聚焦式超音波 FUS [23]

圖 1.1 神經調控方法



1.3.1 聚焦式超音波

FUS 可以透過非侵入性的方式在人體內部進行精確的治療或干預。FUS 通過聚焦超音波波束，在特定的目標組織中產生局部的能量聚集，這樣可以在不損傷周圍組織的情況下對目標區域進行刺激。在 FUS 中，超音波波束經過探頭的聚焦，可以產生高能量密度的聚焦點。這個聚焦點可以在體內精確控制在特定位置，使得能量可以準確地傳遞到目標組織。FUS 可用於醫學診斷和治療，例如治療腫瘤、消除異常組織或區域、調節神經功能等。在醫學應用方面，FUS 已經被證明可以用於非侵入性的手術、癌症治療、神經調控、血腦屏障開放 (BBB opening) 和藥物傳遞等領域。它具有高度準確性、可調節性和低風險等優勢，並且可以在即時監控下進行操作，以確保安全和有效性。FUS 是一種新興的技術，在醫學和生物領域中具有廣泛且高潛力的應用願景。隨著技術的不斷發展和改進，FUS 有望成為更多中央神經系統疾病的治療和干預手段。

FUS 改變人腦活動的確切機制大部分尚不清楚，Darmani 等人最近的一篇綜合綜述將提出的機制分為三類：空化 (cavitation)、溫度變化的熱效應、機械張力 (mechanical force) [27]。

超音波空化是指當壓力降至脂溶性區域的汽化點以下時發生的現象，這會導致神經元膜內部形成振盪性的氣泡，氣泡在細胞膜內部形成，通過電容變化或細胞膜破裂，導致細胞膜電為改變，電位差的變化影響神經細胞膜電位的作動，進而引起神經調控 [28]；溫度變化也是 FUS 的可能機制之一，在超音波引起溫度升高後，神經活動可以被可逆性地抑制，儘管對熱神經抑制的機制理解正在快速發展，但越來越多的證據支持，增加的鉀通道傳導性在其中的作用，它降低靜息膜電位，從而抑制神經元的活動 [29]；近年有表明，脂溶性脂質微組織在低水平機械力之下會被分散，這種分散會導致酶底物混合和機械感知通道配體的產生，雖然目前還不清楚作用於膜上的機械力如何改變通道動力學，但它直接地表明與超

音波也可能在超音神經調控中起作用 [30]。



1.3.2 超音波神經調控治療癲癇

用於癲癇的管理和治療，聚焦式超音波神經調控 (FUS Neuromodulation) 是一種新興的治療方法。它利用超音波技術對腦部進行非侵入性刺激，以調控神經活動和減少癲癇發作。

超音波神經調控這種技術可以將超音波波束聚焦到腦部特定區域，並在該區域產生能量聚集。這些能量聚集可以用於調控神經元的活動，干擾癲癇的發作機制，或促進正常的神經功能。

超音波神經調控具有以下優點：非侵入性，治療過程中無需手術或切口，能夠在不損傷組織的情況下進行治療；精確性，超音波技術可以精確聚焦在特定腦區，並在該區域產生局部的治療效應；安全性，超音波神經調控在正確操作下通常是安全的，且對腦部或身體的其他部位，不會造成不良影響。

超音波神經調控治療癲癇的具體機制還在研究中，但已有一些研究顯示它可以抑制癲癇的神經活動、減少癲癇發作的頻率和強度。

Tufail 使用定向的經顱超音波來刺激海馬迴神經活動和同步興奮，發現超音波在不升高腦溫 ($<0.01^{\circ}\text{C}$) 的情況下，可以觸發對四氫唑啉 (tetrodotoxin, TTX) 敏感的神經活動 [31]。

Min 的動物模型在誘發癲癇發作後，進行兩次三分鐘的 FUS 施打，並進行腦電訊號監測。與 FUS 施打前的癲癇狀態相比，癲癇誘發的大鼠在腦電訊號上的不正常放電明顯減少。經過 FUS 施打的動物還表現出較輕微的癲癇行為。組織學分析證實，FUS 施打並沒有對腦組織造成任何損傷 [26]。

Chen 的實驗觀察到 FUS 施打有效地抑制了癲癇活動，並觀察腦電訊號的頻

譜，不正常放電抑制效應取決於 FUS 參數的選擇。在皮質 (cortex) 和海馬迴中確認了組織染色 c-Fos 和 GAD65 的變化，表明 FUS 使興奮性細胞失去活性並激發 GABA 相關機制的神經傳導物質，為抑制癲癇的機制探討提供進一步證據 [24]。

Zhang 使用 LIFU 對癲癇大鼠的海馬迴進行刺激，分析了腦電訊號的功能腦網路，探索了 LIFU 對癲癇腦網路的影響。發現 LIFU 顯著影響了功能腦網路，尤其是在低頻帶。與對照組相比，FUS 刺激後的多個腦區之間的網路連結 (connectivity) 強度顯著降低 [32]。

Yoo 通過電生理記錄和功能性磁振造影實現的功能腦映射，對聲音刺激所影響的腦功能進行了臨時性的描述。調製效果呈雙峰分佈，可以刺激或選擇性抑制腦活動 [28]。

KIM 在麻醉的大鼠腹腔內注射了戊四氮 (Pentylentetrazole) 以誘發癲癇。在麻醉過程中，測量和分析了腦電訊號持續 1 小時，分為未接受 FUS 和接受 FUS 的兩組動物組。結果表明，多次重複的 FUS 可以通過減弱戊四氮誘發的大鼠模型中，theta 腦波和 beta 波的振盪，來有效地減少癲癇發作活動。FUS 可能通過增強 GABA 能抑制性神經元的抗癲癇效果，促進海馬迴和皮質細胞的恢復 [33]。

Todd 透過聚焦超音波血腦屏障開放，降低了右側 S1HL(primary somatosensory cortex hind limb region) 與其他感覺運動區域之間的功能連接性，包括與左半球同構區域 (即左 S1HL) 之間的連結性，也在統計學上顯著降低。儘管不清楚這種影響是血管還是神經活動改變所造成，但這些結果表明，即使是安全水平的聚焦超音波血腦屏障開放，也會對驅動功能性磁振造影測量的生理過程產生影響 [2]。

Bubrick 開發了一種用於治療顳葉內側癲癇的 FUS 設備，並在人體試驗對象中進行了完成度很高的安全性和耐受性試驗。有 4 名患有顳葉內側癲癇的成年人，在 3 週內接受了 6 次針對海馬迴的 FUS 治療，結果表明 FUS 可以非侵入性且安全地調節人類海馬迴 [34]。



Chu 探討了一系列短脈衝 FUS(pulsed FUS) 在撲翼酸 (Kainic Acid) 顛葉癲癇動物模型中，抑制腦電圖訊號癲癇不正常放電的療效和有效時間，證明了低強度 pulsed FUS 可以調控癲癇，效果可長達 7 週，如果在臨床環境中這樣的效果得到再現，將會是癲癇的一種有力的非侵入性治療方法 [25]。

Lee 招募了進行立體腦電圖 (Stereoelectroencephalography, SEEG) 定位癲癇起始區 (Seizure Onset Zone, SOZ) 的 DRE 患者。使用神經導航引導的 FUS 系統對 SOZ 進行 FUS 治療。有 6 名患者符合入選標準並完成了 FUS 治療。在 3 天的隨訪期內，觀察到兩名患者癲癇發作頻率減少；治療後的磁振造影顯示沒有病變也沒有腦水腫跡象。在 FUS 治療期間，注意到了立體腦電圖的頻譜能量中有顯著變化 [23]。

總結來說，超音波神經調控作為一種新興的癲癇治療方法，具有高度潛力與應用價值。但超音波神經調控作為癲癇治療的臨床應用，還需要進一步的研究和試驗來驗證其有效性和安全性。隨著技術的不斷發展和研究的深入，它可能成為未來癲癇治療的最佳有效選擇之一。

超音波目前對癲癇模型呈現一定程度的抑制效果，觀察到超音波治療後動物的癲癇訊號有減少的趨勢，但因為收集到的腦電訊號是表層腦區 (例如皮質) 的膜電位，對於病兆位置 (即海馬迴) 區域的詳細腦電資訊還不夠明確，故需要透過在深層腦區植入電極來量測腦電訊號，為超音波治療癲癇做進一步的證實；此外，功能性磁振造影作為研究分析腦部功能性連結的有力工具，過往研究可透過功能性磁振造影來研究癲癇腦功能連結的變化 [35]，也能探究 FUS 施於腦部時對腦功能連結產生的影響 [36]，故透過功能性磁振造影來探索超音波治療癲癇模型的效果，也是值得深入探討。

我們預期超音波施於癲癇小動物模型後，透過腦電訊號可觀察到動物的海馬迴區域中不正常放電量減少；針對有不正常放電的腦區迴路，也就是巴貝茲迴路，

在功能性磁振造影觀察到的神經活動強度與功能性連結，經超音波治療後也有干預的效果。為了在同一動物模型上觀察功能性磁振造影與腦電訊號，有發展 MR 相容腦電訊號系統的必要性。






1.4 評估治療效果：功能性磁振造影與腦電訊號

1.4.1 功能性磁振造影

功能性磁振造影 (Functional Magnetic Resonance Imaging, fMRI) 是一種用於測量大腦活動的非侵入性影像學技術。它通過利用磁振造影 (Magnetic Resonance Imaging, MRI) 技術，檢測大腦血氧水平的變化，來間接反映出腦區的神經活動。功能性磁振造影技術提供了對大腦活動的非侵入性、高空間解析度和相對較高的時間解析度。它在研究認知、感知、運動、語言和情緒等各個方面的腦功能具有廣泛的應用。再者，研究人員也可以通過 fMRI 來研究神經疾病和精神疾病中的腦區功能異常。

在功能性磁振造影中，受試者被置於 MRI 儀器中，通過對大腦進行連續的快速掃描，可以觀察到大腦不同區域的血氧水平變化。這種血氧水平變化與神經活動之間存在著一種關聯性，被稱為血氧水平依賴性 (blood oxygenation level dependent, BOLD) 訊號。

BOLD 訊號作為功能性磁振造影的信號來源，用於間接反映腦區的神經活動。BOLD 機制為當某個腦區域的神經活動改變時，血液中血氧濃度的變化改變了磁振造影訊號來源的強度。血液中具有攜帶氧氣能力的血紅素，分為帶氧血紅素與去氧血紅素，兩者有不同的磁場，帶氧血紅素為逆磁性 (Diamagnetism)，去氧血紅素則為順磁性 (Paramagnetism)。當大腦神經活動增加時，血液中的帶氧血紅素上升，逆磁性的帶氧血紅素會對周圍磁場產生干擾，導致 BOLD 訊號上升；反之，當血液中的去氧血紅素上升時，順磁性的去氧血紅素上升導致 BOLD 訊號下降。當該區域的血氧水平改變時，會在 fMRI 圖像上呈現出訊號強度的差異，如此便可以根據 fMRI 圖像來推斷不同腦區的活動狀態。這種含氧血液和未含氧血液之間的差異可以在 fMRI 圖像中被檢測到，並以 BOLD 信號的形式呈現出來。



BOLD 信號在 fMRI 研究中被廣泛應用，它提供了對大腦活動和功能性連接的非侵入性測量。通過分析 BOLD 信號，研究人員可以識別不同腦區之間或是腦迴路中各腦區的功能聯繫，探索大腦在認知、感知、運動、語言和情緒等方面的活動模式。值得注意的是，BOLD 信號並不直接反映神經元的活動，而是通過血氧改變來間接反映出神經活動的變化。此外，BOLD 信號的解釋需要謹慎考慮，因為它受到多種因素的影響，包括血流動力學、血氧補償機制和腦血流自我調節等。

靜息態功能性磁振造影 (Resting-State fMRI, rs-fMRI) 是一種功能性磁振造影的應用，用於研究大腦在安靜狀態下的神經活動。在 rs-fMRI 中，受試者在不進行特定認知任務或刺激的情況下，處於放鬆且閉目的狀態下進行掃描。在這種情況下，大腦的神經活動呈現出一種自發的、無目標的狀態，被稱為靜息狀態 (Resting-State)。rs-fMRI 通過記錄大腦各個區域的血氧水平變化，可以獲得與靜息狀態下的神經活動相關的腦區間功能連結性。

rs-fMRI 的主要指標是功能連結 (functional connectivity, FC)，即不同腦區之間的相關性。這些功能連接可以在沒有明確認知任務的情況下揭示大腦內部的神經網絡結構和功能組織。通過分析 rs-fMRI 數據，可以檢測到具有相似功能的腦區之間的功能連接，並研究這些連接在正常和疾病狀態下的變化。

rs-fMRI 具有幾個重要的應用，包括：

1. 功能連接分析

通過分析 rs-fMRI 數據，可以研究大腦內不同區域之間的功能聯繫，並揭示大腦的組織、網路與功能性連結。

2. 疾病診斷和監測

rs-fMRI 可以應用於疾病的診斷和監測，例如腦部疾病、精神疾病和神經退行性疾等，並提供疾病相關的腦功能變化信息。



3. 生理和心理研究


rs-fMRI 可以用於探索正常大腦的生理和心理過程，例如記憶、情緒、語言和感知等。

儘管 rs-fMRI 提供了對大腦功能和組織的獨特洞察，但也存在一些限制。例如，rs-fMRI 受到頭部運動、生理噪聲和數據分析方法等因素的影響，需要適當的方法來處理這些問題。由於 fMRI 測量的是血氧水平變化，它只提供間接的神經活動信息，並不能直接觀察到神經元的活動，fMRI 的解析度受限於技術本身的局限性，無法提供單個神經元級別的詳細信息。

針對癲癇進行的 fMRI 研究，Chen 等人發現與對照組相比，右腦 TLE 患者的雙側視丘內和之間的功能性連結降低。此外，在患者組中，雙側前扣帶回和亞皮質區域，包括雙側腦幹、小腦、尾狀核、右側尾狀核和杏仁核，其與同側視丘的功能性連結降低，而與對側視丘的功能性連結無明顯變化。患者在行為上，內在和階段性警覺性表現受損，但與視丘功能性連結降低無相關性。與此同時，右腦 TLE 患者的警覺性表現未受到改變，但與前扣帶回降低的視丘功能性連結呈負相關 [37]。

巴貝茲迴路的 fMRI 研究中，ANT 被確定為網絡中的中心樞紐，具有最高的接近中心性值，而中央間核和海馬迴顯示了平均中心性值。尾狀核和視丘丘-視丘束也顯示出較高的中心性值。前扣帶回皮質被確定為與癲癇深部腦刺激效果相關的重要皮質中樞。癲癇深部腦刺激網絡中確定的兩個皮質簇包括與靜息態網路相對應的區域，主要是默認模式和顯著性網絡。我們的結果與對癲癇深部腦刺激患者進行靜息態功能磁振造影研究的系統回顧的結果一致。研究結果表明，各種癲癇深部腦刺激目標共享一個共同的皮質-皮質下網絡，這在一定程度上可能是刺激的抗癲癇效應的基礎 [38]。

Middlebrooks 等人的研究中，針對 ANT 的 DBS 反應者在默認模式網絡中與



非反應者相比，表現出更大的正向連接，包括後扣帶皮質、前頭葉中央皮質、下頂葉葉及楔前葉。有趣的是，反應者中還觀察到與海馬迴一致的反相關，而這在非反應者中不存在。根據這項初步研究，研究人員觀察到對癲癇患者進行成功針對 ANT 的 DBS 會增加默認模式網絡的連接性，研究人員假設這會增加癲癇傳播的閾值。此外，通過增加海馬迴 GABA 濃度，對海馬迴產生抑制作用可能有助於抑制癲癇 [39]。

總體而言，功能性磁振造影是一種重要的神經影像學技術，它提供了研究大腦功能和神經活動的有力工具。通過結合其他腦影像學技術和行為測量，功能性磁振造影有助於深入理解大腦在健康和疾病狀態下的功能組織。BOLD 訊號是功能性磁振造影中的一個重要指標，用於研究大腦的神經活動，它提供了對大腦功能和功能連接的研究參考，並促進了對認知和神經疾病等領域的深入理解。rs-fMRI 是一種用於研究大腦靜息狀態下神經活動的重要工具，它可以提供關於大腦組織和功能連接的信息，並在神經科學、臨床醫學和認知研究等領域有廣泛的應用價值。透過功能性磁振造影去分析腦區的連結性網路，並比較正常腦與癲癇腦在網路上的不同，有助於分析癲癇模型中各腦區的神經活性變化。

1.4.2 腦電訊號

腦電訊號 (Electroencephalography, EEG) 是一種用於記錄和測量大腦電活動的非侵入性技術。它通過在頭皮上放置電極，檢測和記錄腦部神經元的電活動。EEG 能夠捕捉到大腦神經元的電活動產生的微弱電信號。這些信號反映了大腦在不同時間和空間上的神經活動模式，並提供了對大腦功能和神經狀態的信息。

EEG 在臨床和研究領域具有廣泛的應用，包括：

1. 癲癇診斷和監測

EEG 是診斷和監測癲癇病人的重要工具。癲癇發作時，腦部神經元的電活

動會產生明顯的變化，這些變化可以在 EEG 圖像中被觀察到。

2. 睡眠研究

EEG 可用於研究睡眠和覺醒的不同階段，並評估睡眠質量和睡眠障礙。

3. 認知和行為研究

EEG 可以用於研究不同認知和行為任務下的大腦活動模式，例如記憶、專注力、情緒和語言等。

4. 神經擴展性和神經反饋

EEG 可用於神經反饋訓練，幫助人們學習調節自己的腦部活動，例如對焦和放鬆。

5. 神經疾病研究

EEG 可以用於研究神經疾病，如帕金森病、阿茲海默病和注意力不足過動症等，並提供有關這些疾病的腦部活動模式的信息。

當談到癲癇與腦波的關係時，EEG 是一種常用的檢查方法。腦電圖通過在患者的頭皮上放置多個電極，記錄大腦的電活動。這些記錄到的腦電波可分為不同的頻率帶，包括 delta、theta、alpha、beta 和 gamma 波，其中，EEG 對於癲癇診斷和監測，常分析 theta 腦波。theta 腦波是指大腦中的一種特定頻率的電活動，其頻率大約在 4-8Hz，這種腦波通常在人們處於放鬆、閉眼休息、入睡或處於淺睡狀態時出現，然而，在某些情況下，theta 腦波的變化可能與癲癇有關 [6] [33]，故在癲癇的研究和診斷中，分析 theta 腦波是很重要的，因為它可以提供有關癲癇發作和大腦功能的有用信息。

分析 theta 腦波可以幫助研究人員和醫生更好地了解癲癇發作的過程和機制，癲癇發作可能與特定腦區的神經元過度同步放電有關，這可能在 EEG 中呈現為特定頻率的腦波變化，theta 波在振幅的變化或不正常波型發生頻率的改變，例如突發的高振幅腦電波，稱為尖波 (spike)；在診斷癲癇時，EEG 是一種非常重要的檢

查方法，檢測患者腦電圖中的 theta 腦波變化，可以幫助確定是否存在與癲癇相關的腦電活動，腦電圖中的 theta 腦波變化可以幫助醫生選擇合適的抗癲癇藥物和治療方案，在治療過程中定期檢測腦電圖，特別是 theta 腦波的變化，可以用於監測治療效果和發現可能的癲癇發作。

儘管 EEG 具有許多應用和優勢，但也存在一些限制。例如，EEG 只能檢測到頭皮下的腦部活動，對於深層結構的活動了解較少，透過植入深層電極可改善此限制。此外，EEG 受到心跳、呼吸、肌肉運動和其他外部干擾的影響，需要進行適當的後處理和分析，例如頻譜分析與統計數據量化。

總結來說，EEG 是一種重要的技術，用於記錄和測量大腦的電活動。它在臨床診斷、腦功能研究和神經疾病等領域具有廣泛的應用價值，可以提供對大腦活動模式和功能狀態的重要信息。



1.5 研究目的與貢獻

本研究調查 FUS 達到抑制癲癇的效果，旨在探討利用 rs-fMRI 和 EEG 來研究 FUS 施打誘導的抗癲癇效應，在藥物誘發癲癇的小動物模型中的可行性。FUS 具有成為調控腦神經活動的有效干預工具的巨大潛力，並有可能抑制癲癇，我們透過藥物注射使動物在一定時間內誘發急性癲癇，並預期在腦區內呈現全面性癲癇不正常放電的狀態，其中針對巴貝茲迴路的海馬迴與視丘等腦區進行探究，預期在 FUS 於視丘施打後，可觀察到海馬迴不正常放電減少的情形。同時，也會對動物腦區進行 rs-fMRI 掃描與分析，觀察腦內神經活性與腦區間的功能性連結，在藥物誘發癲癇後與 FUS 施打後所發生的改變。

本研究在這裡展示了通過利用 EEG 和 rs-fMRI 來輔助評估 FUS 引起的抗癲癇效應的方法是可行的；本研究還展示了在相同的癲癇動物模型中將 rs-fMRI 監測和 EEG 成功地結合起來，以評估注射後藥物誘導的癲癇信號，以及評估 FUS 施於癲癇模型後，神經調控抑制癲癇的效果。



第二章 方法與理論

2.1 實驗架構

本研究所提出的系統，目的是建置一個小動物疾病模型，在同一隻動物上觀察到 EEG 與 fMRI 的訊號，並能在藥物誘發急性癲癇後，看到 EEG 與 fMRI 上訊號的改變；再者，誘發癲癇後該動物模型可接受聚焦式超音波施打，並藉由 EEG 與 fMRI 去探究超音波施於癲癇模型的神經調控成果。系統架構如圖2.1所示，EEG 透過 MR 相容電路系統與 EEG 記錄系統做訊號蒐集，MRI 影像與 fMRI 藉由 Bruker 7T MRI 做掃描，超音波探頭則是利用訊號產生器與功率放大器做驅動。

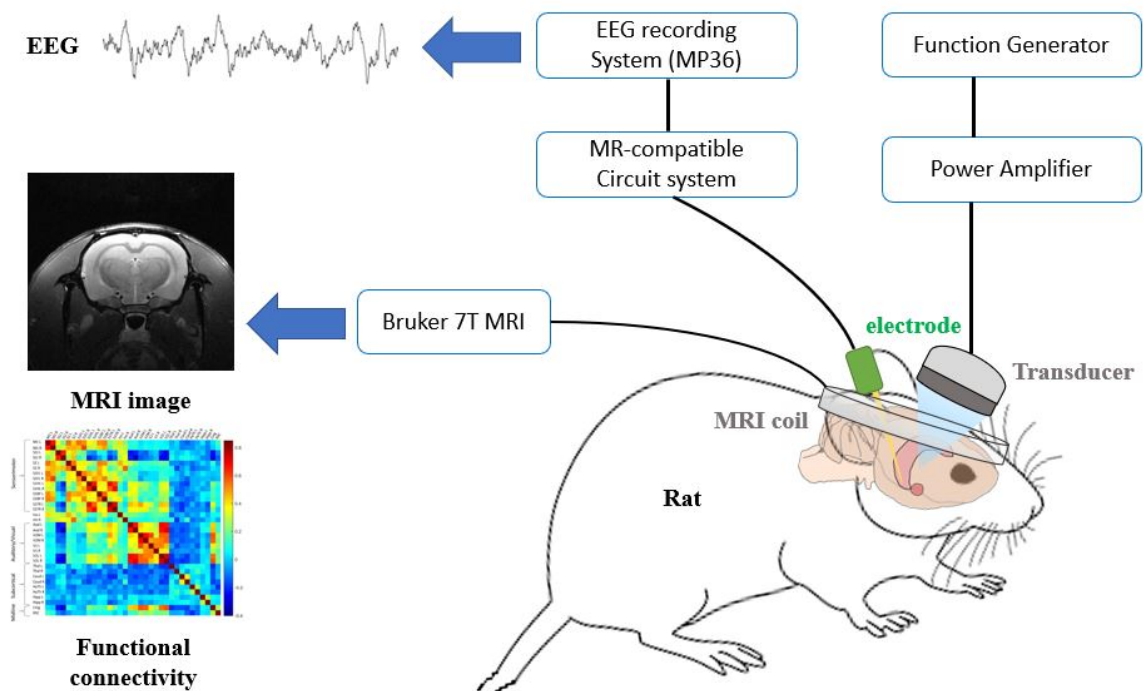


圖 2.1 本研究之實驗架構

實驗動物選用選用 SD 大鼠 (Sprague-Dawley rats)，所有的動物實驗均經由國立台灣大學動物照護與使用委員會 (IACUC No. NTU-110-EL-00148) 的批准。動物被放置在每日 12 小時的光照和夜晚循環下，並可自由進食和飲水。我們使用了 32 隻 SD 大鼠 (306-348g, BioLASCO Co., Ltd., Taiwan) 進行實驗，實驗分組如表 2.1，分為 EEG 與 fMRI 兩大族群，再各別細分為做為控制組的 Normal 組、PTZ(+)/FUS(-) 組與 PTZ(+)/FUS(+) 組。Normal 組代表正常動物，不做癲癇藥物注射也不做超音波施打；PTZ(+)/FUS(-) 代表該組別的動物會進行癲癇藥物注射，但不做超音波施打；PTZ(+)/FUS(+) 代表該組別的動物，在進行癲癇藥物注射並觀察癲癇訊號後，會進行超音波的施打。

表 2.1 實驗動物分組

Group	EEG/fMRI	Name	Animal numbers (n)
1	EEG	Normal	4
2	EEG	PTZ(+)/FUS(-)	6
3	EEG	PTZ(+)/FUS(+)	8
4	fMRI	Normal	4
5	fMRI	PTZ(+)/FUS(-)	6
6	fMRI	PTZ(+)/FUS(+)	6

本實驗架構的核心技術分為四大項，癲癇動物模型部分包含癲癇藥物與麻醉的選擇，以及電極植入手術；FUS 部分包含硬體設備、聲場量測、強度換算與神經調控參數介紹；EEG 部分包含量測系統與資料後處理；fMRI 部分包含硬體設備、掃描參數與資料後處理。



2.2 動物模型準備

2.2.1 癲癇藥物

目前常見的動物誘發癲癇藥物，主要有 Kainic acid(KA)、Pentylentetrazole(PTZ)、Pilocarpine，其誘發癲癇資訊與使用上的特行如表 2.2。KA 主要藉由注射在深層腦區來誘發慢性癲癇，發作頻率約每週 2 到 3 次；PTZ 在注射之後誘發急性全腦癲癇，持續效果的時間隨著注射劑量與濃度而有所不同；Pilocarpine 也是注射之後誘發急性癲癇，主要用於動物行為觀察，但因為致死率較高近年來已較少應用於研究。本研究目標是在藥物注射後立即觀察 EEG 與 fMRI 訊號，同時考量動物存活率的部分，我們採用 PTZ 作為本次研究誘發癲癇的使用藥物。

表 2.2 常見的誘發癲癇藥物

藥物名稱	癲癇模型	特性	文獻回顧
Kainic acid(KA)	Chronic, temporal lobe epilepsy	Long-term EEG, behavior observation	[25]
Pentylentetrazole(PTZ)	Acute, generalized epilepsy	Immediate seizure, desired dosage	[24]
Pilocarpine	Acute, limbic epilepsy	Behavior observation, high mortality rate	[40]

2.2.2 麻醉藥物

選定誘發癲癇藥物為 PTZ 之後，要配合實驗選用動物麻醉藥物，目標為避免藥物麻醉的生理機制與 PTZ 誘發癲癇機制互相影響，同時也能在該藥物麻醉的情況下取得品質良好穩定的 EEG 與 fMRI 訊號；再者，該麻醉藥物也不能影響超音波神經調控的效果。PTZ 與若干常見麻醉藥物生理機制與在台灣的管制等級如表 2.3，參考資料來自台灣動物照護與使用委員會。

PTZ 的生理機制為與 GABA_A 受體 (GABA_A receptor) 結合成化合物，該化合物會減少氯離子通過神經細胞離子通道，進而造成神經訊號傳遞的興奮，模擬

表 2.3 PTZ 與麻醉藥物機制與管制等級

藥物名稱	生理機制	台灣管制等級
Pentylentetrazole (PTZ)	GABA _A receptor complex causes convulsant ion channels increases calcium and sodium influx	
Isoflurane	GABA _A receptor positive allosteric modulator	
Halothane	activates GABA _A and glycine receptors	
Sevoflurane	NMDA receptor antagonist	
Medetomidine(Dex)	α2 adrenergic agonist	
Zoletil(Telazol)	NMDA receptor antagonist	
Xylazine(Rompun)	α2 adrenergic agonist	
Ketamine	NMDA receptor antagonist	第三級管制藥
Fentanyl	Opioids(鴉片類藥物), μ-receptor agonist	第二級管制藥
Chloralose	GABA _A receptor positive allosteric modulator	
Alphaxalone	GABA _A receptor positive allosteric modulator	
Propofol	GABA _A receptor positive allosteric modulator	第二級管制藥

癲癇的神經細胞不正常放電；而若干麻醉藥物例如 Isoflurane、propofol 等，則是作為 GABA_A 受體的正向異位性調節劑 (positive allosteric modulator)，效果為加強 GABA 抑制中樞神經的作用，故會影響 PTZ 誘發癲癇的效果。此外，Ciltas 等人在 2022 年的研究指出，α2 腎上腺素受體作用劑 (α2 adrenergic agonist) 為機制的麻藥如 Medetomidine，也會造成抑制 PTZ 誘發癲癇的效果 [41]，故不適合作為癲癇動物模型的麻藥。經過篩選後，我們針對 Sevoflurane、Zoletil、Ketamine 這三種麻醉藥物作進一步探討。

若干常見麻醉藥物在癲癇模型、FUS、fMRI 上的文獻回顧與使用特性如表 2.4。針對 Sevoflurane、Zoletil、Ketamine 這三種麻醉藥物，文獻回顧上 Ketamine 常與 Xylazine 混和後，用於癲癇動物模型，但根據藥物生理機制，考量 Xylazine 作為 α2 腎上腺素受體作用劑會一定程度抑制 PTZ 誘發癲癇的效果，且文獻中的實驗設計大多為每隻動物一完成實驗就立即犧牲，並不符合本研究的需求；Zoletil 作為動物常用的肌肉鬆弛劑，也會與 Xylazine 混和使用，且文獻回顧上沒有 Zoletil 應用於 fMRI 實驗的過往案例，故本研究也不採用；Sevoflurane 為氣體麻醉 (Inhalational anesthetic) 藥物，其在癲癇、FUS、fMRI 的實驗中皆有使用案例，其生理機制為 NMDA 受體拮抗作用 (NMDA receptor antagonism)，減少鈣



離子與鈉離子通過神經細胞離子通道，進而達到麻醉的效果，相較於 GABA_A 受體的正向異位性調節劑，該 NMDA 生理機制不與 PTZ 誘發癲癇的機制相互衝突，故選擇 Sevoflurane 作為本研究所使用之麻醉藥物。

表 2.4 常見麻醉藥物與使用特性

藥物名稱	投藥方式	FUS	fMRI	癲癇模型
Isoflurane	IH	影響 FUS 效果	血管擴張 [42]	影響 GABAergic
Halothane	IH	可使用	血管擴張	可使用 [43]
Sevoflurane	IH	可使用 [44]	清楚的訊號 [45]	不影響 PTZ 閾值 [46]
Medetomidine	IM	可使用 [47]	可使用 [42]	抑制 PTZ [41]
Zoletil(Telazol)	IP	搭配 Xylazine	較少文獻	搭配 Xylazine [48]
Xylazine(Rompun)	IP	搭配 Ketamine	搭配 Ketamine	搭配 Ketamine
Ketamine	IP	搭配 Xylazine	搭配 Xylazine	搭配 Xylazine
Fentanyl	IP	較少文獻	對聲音敏感 [49]	搭配 Zoletil
Chloralose	IP	搭配 Urethane	結果類似 Dex [42]	影響 EEG [50]
Alphaxalone	IV	較少文獻	較少用在大鼠	抗癲癇藥 [51]
Propofol	IM	可使用	可使用	抑制 EEG Burst [52]

備註：IH: 吸入性, IV: 靜脈注射, IM: 肌肉注射, IP: 腹腔注射

2.2.3 電極植入手術

為了在癲癇動物模型中同時觀測 EEG 與 fMRI 並施打 FUS 進行神經調控，需要針對動物腦部進行 MR 相容微電極以及超音波探頭用機構的植入手術。

可植入式微電極陣列通過同時記錄不同群組神經元的信號，收集複雜神經過程的時空信息，對大腦功能研究至關重要。微電極陣列具有幾項優勢，包括精確定義的記錄位點配置、高密度電極放置能力，以及與薄片上積體電路的組合潛力。然而，組織與電極接觸處的微運動一直是應用基於矽的微電極陣列進行長期記錄的一個主要問題。低訊雜比 (Signal-to-noise ratio, SNR) 的神經信號降低了腦波檢測和分析的準確性。雖然在低 SNR 條件下可以使用多種強大的算法來檢測和分析腦波，但減少電極的阻抗以提高 SNR，將進一步改善結果的準確性。設計一種能在重複電解損傷後保持高信號記錄質量的微電極陣列已成為近期神經技術研究和開發中最重要問題之一。

Chen 等人提出了一種 MR 相容的微電極陣列探針 [1]，如圖 2.2。這種基於聚酰亞胺的薄、堅韌和柔軟基板對植入部位的組織造成較少損害，並於動物手術中實現了精確的植入結果。利用簡單的微製造過程創建的粗糙三維表面，為電極提供了大而有效的表面積，並在體內測量期間具有低阻抗。其厚度增加也提高了電極對重複電解損傷的耐受性。此外，長期記錄腦波的結果顯示高 SNR 的神經信號和小的電極阻抗變化，故選用此電極作為本研究所使用之腦電訊號紀錄來源。

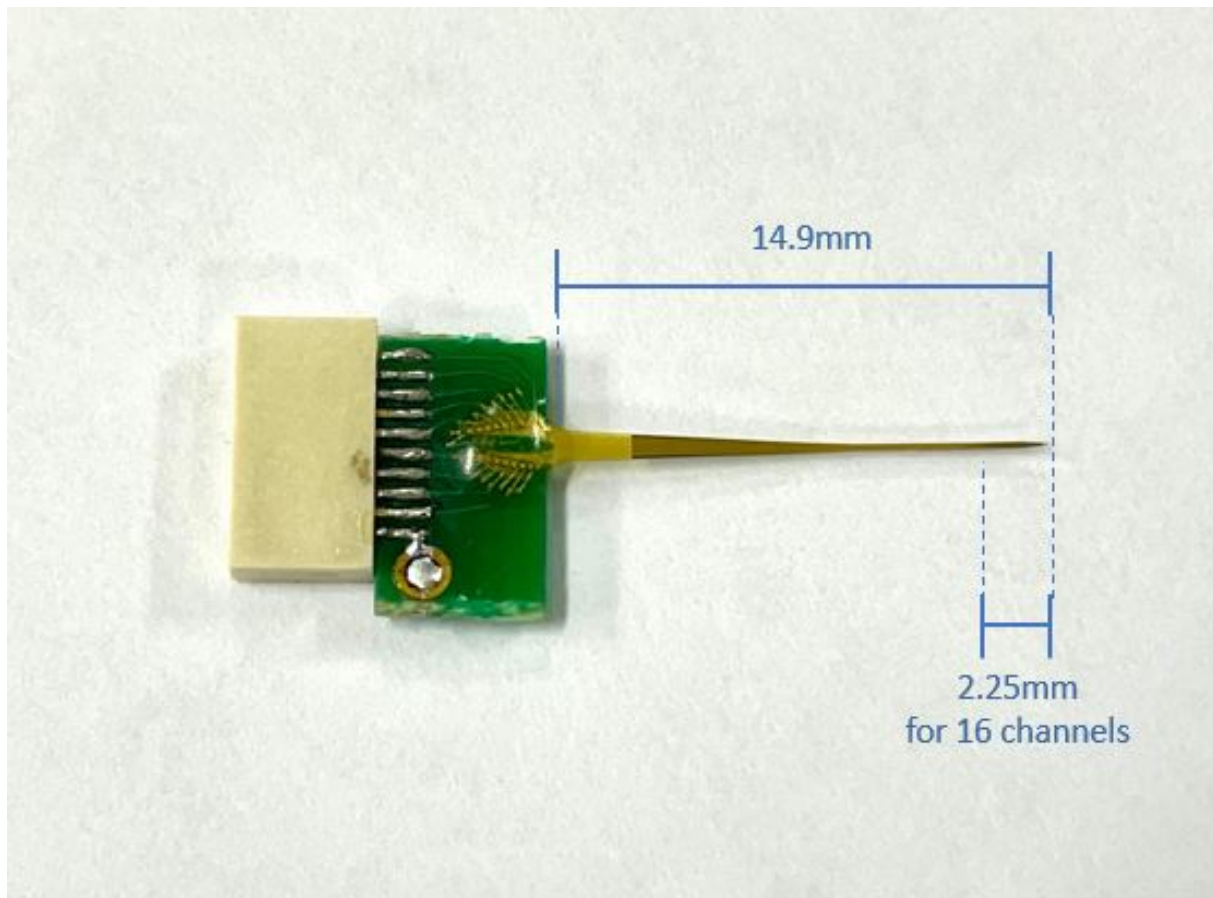


圖 2.2 MR 相容白金電極，可植入長度 14.9mm，其中前 2.25mm 為記錄 EEG 訊號的 16 channels [1]

在手術前，參考鼠腦圖譜 [53]，需要規劃電極植入位置與超音波施打位置相對應的腦區。由於海馬迴是癲癇的病灶之一，PTZ 誘發的全面性癲癇也會連帶使巴貝茲迴路不正常放電 [20]，故將電極植入位置定位在海馬迴的 CA1 位置 (AP:-9.0mm, ML:4.5mm, DV:9.0 mm)，如圖 2.3；參考過往文獻施打 FUS 的位置 [26] [24]，以及巴貝茲迴路進行腦區選擇，超音波焦點為橢圓形，焦點直徑 1mm，長度 2mm，經圖譜規畫後焦點範涵蓋視丘正中核 (Centromedian Nucleus,

CM) 與視丘前核 IAM，如圖 2.4。期望 FUS 施打視丘後，透過巴貝茲迴路來抑制海馬迴乃至各腦區的癲癇訊號。由於實驗過程需要在機構上擺放超音波探頭，若電極採用垂直植入腦區的方式，會阻擋超音波探頭擺放位置，故設計將電極以傾斜角度 26.5° 由大腦後側植入動物腦部。

電極植入手術過程如圖 2.5，可大致分為以下步驟：使用 Isoflurane(3%, 800ml/min with 100% Oxygen) 將動物麻醉、利用剃毛刀與除毛膏將頭部除毛、用酒精與碘酒進行消毒，並沿頭骨中心剪開頭皮，大小約 3x1cm、標記好 bregma 與 lambda 點位後，依據圖標記需要鑽孔的點位、用鑽頭以轉速 500-1000 在頭骨鑽孔，將塑膠螺絲固定在頭骨上、依據傾斜角度與深度植入電極，如圖 2.5(a)、將超音波用機構擺在 FUS 點位，如圖 2.5(b)。最後混和並填入牙粉，將頭骨、頭皮、螺絲與電極固定在一起，如圖 2.5(c)，並進行術後觀察帶動物恢復，如圖 2.5(d)。手術一週後動物會進行 MRI 結構影像掃描，確認電極成功植入至目標腦區海馬迴 CA1，如圖 2.6，其中 axial 面掃描已依據電極斜插角度調整掃描視窗，故可完整看到整根 MR 相容電極植入大腦的影像。

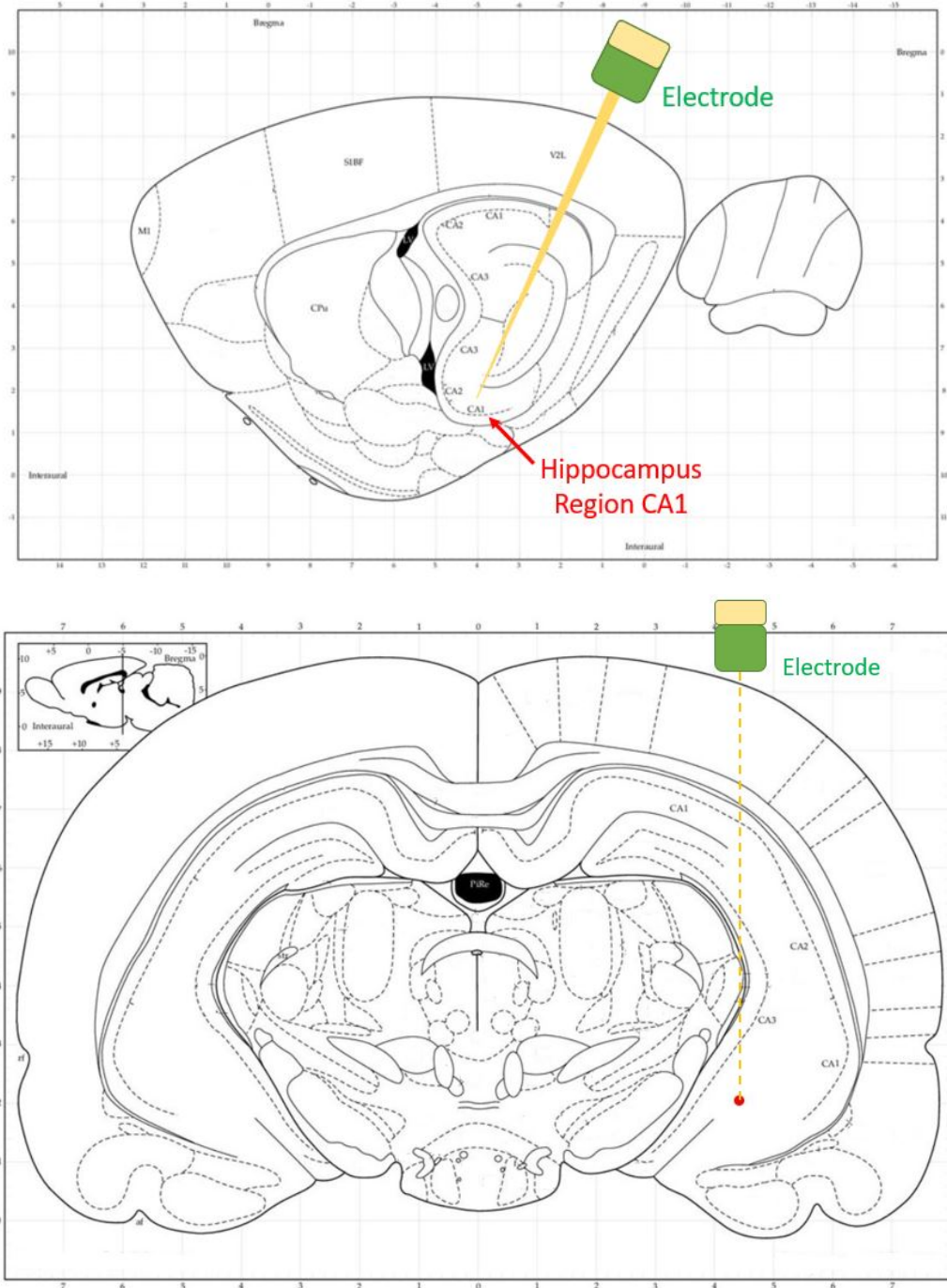
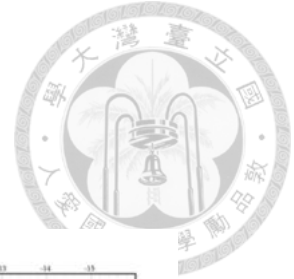


圖 2.3 規劃電極植入位置，以斜插方式植入在海馬迴 CA1

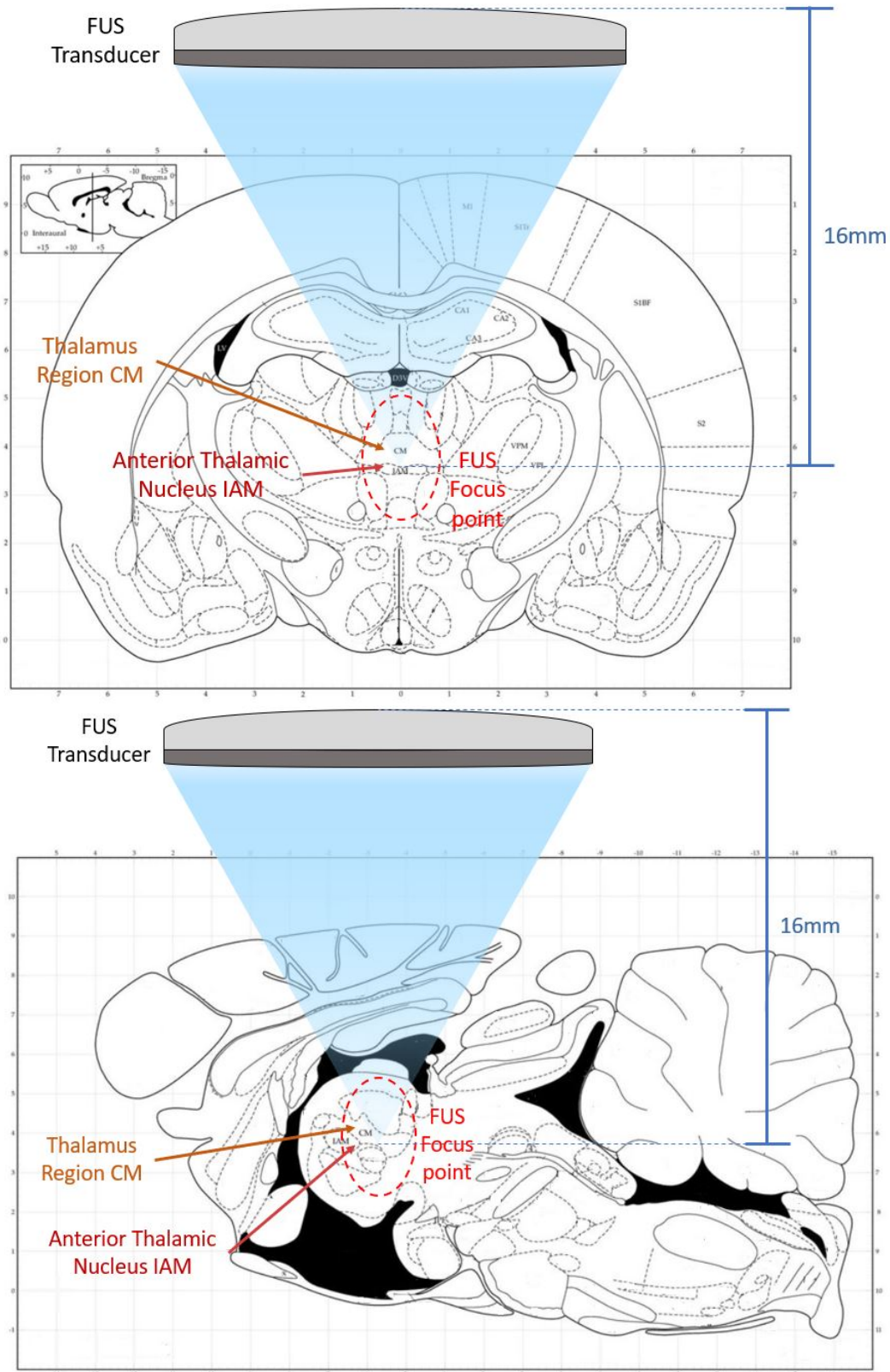


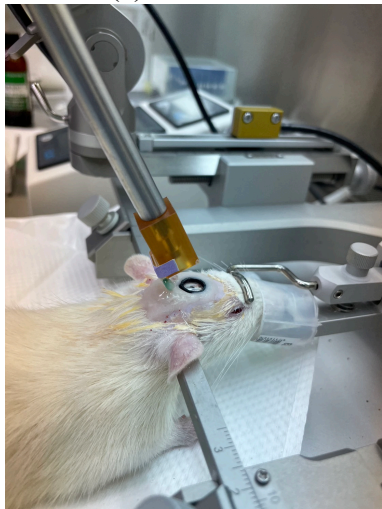
圖 2.4 規劃超音波施打位置，焦點涵蓋視丘 CM 與視丘前核 IAM



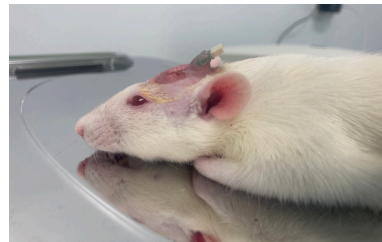
(a) 電極植入



(b) 機構固定



(c) 牙粉填入



(d) 手術完成

圖 2.5 電極植入手術流程

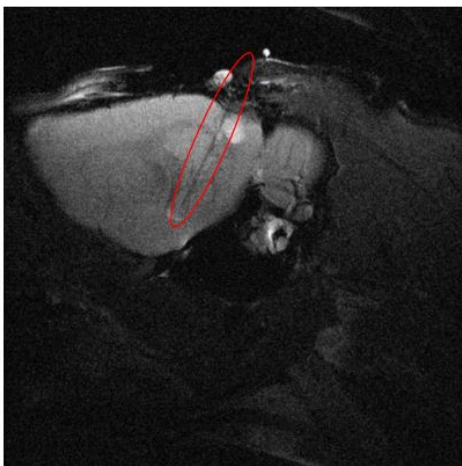


圖 2.6 經 MRI T2 結構影像確認電極成功植入至目標腦區海馬迴



2.3 聚焦式超音波刺激系統

2.3.1 硬體配置

本研究使用一個碗形的聚焦式超音波探頭 (Sonic Concept, USA; 基本頻率為 1.0 MHz, 半徑曲率為 16.0mm; 直徑為 16.0mm), 搭配 3D 列印出的圓錐狀機構, 高度為 8.0mm, 如圖 2.7(a)。超音波探頭本身與一條 MR 相容的傳輸線做焊接, 並於傳輸線另一端焊接 BNC 接頭, 以連接超音波驅動設備的功率放大器。為了進行超音波能量輸出, 1.0 MHz 的射頻 (Radio frequency, RF) 信號由一個訊號發生器 (AFG-3022, GWInstek, Taiwan) 生成, 並由一個射頻功率放大器 (210L, 10 kHz to 20 MHz, Class A, 10W RF Amplifier, E&I, USA) 放大, 放大倍率為 1000 倍, 放大器的輸出連接 BNC 接頭輸出給超音波探頭。

2.3.2 聲場量測與強度換算

聲場 (acoustic field) 是在一個填滿去離子化脫氣水的丙烯酸水槽中測量, 如圖 2.7(b), 測量使用一個移動針水聽筒 (HNA-0400, ONDA Corp., Sunnyvale, California, USA) 固定一個三軸定位系統 (ASTS03, ONDA Corp., Sunnyvale, California, USA) 上, 由步進馬達控制, 步長為 1mm, 超音波探頭連同機構被浸入一個水箱中, 並用黏土固定在底部, 對準水聽筒尖端, 透過示波器確認水聽筒接收訊號, 如圖 2.7(c)(d)。聲場量測的軸向 (xz 平面, 測焦點中心) 和橫截面 (xy 平面, 測焦點深度) 的面積分別為 10x20mm 和 10x10mm, 如圖 2.7(e)(f)。量測結果顯示超音波聲場的半最大壓力振幅的直徑和長度分別為 1mm 和 2mm, 符合預期超音波焦點大小, 在將這個超音波能量區域與大鼠腦部地圖對應時, 超音波軌跡涵蓋目標視丘區域。

超音波穿過大鼠的顱骨時或造成聲波強度的衰退, 根據 Meaghan 研究成

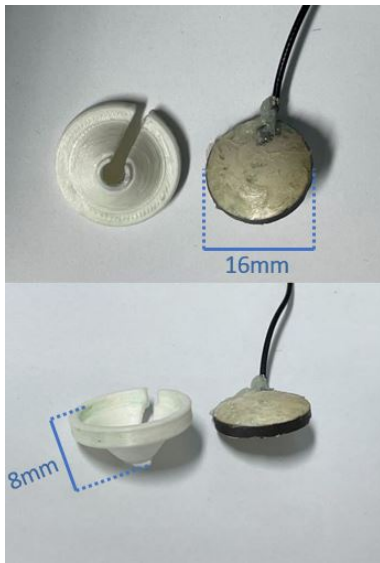
果,1.0 MHz 探頭約會造成 40% 的強度衰退 [54]，故利用水聽筒量測完成不同驅動訊號 (50-650mVrms) 對應聲場強度的曲線圖後，需要再計算穿顱後的聲場強度，才能進行超音波神經調控參數 Mechanical Index(MI) 的換算，如圖 2.8。MI 值為過往 FUS 抑制癲癇文獻的重要參數，根據不同頻率的探頭與驅動訊號強度導致的聲壓換算而成。

2.3.3 刺激參數

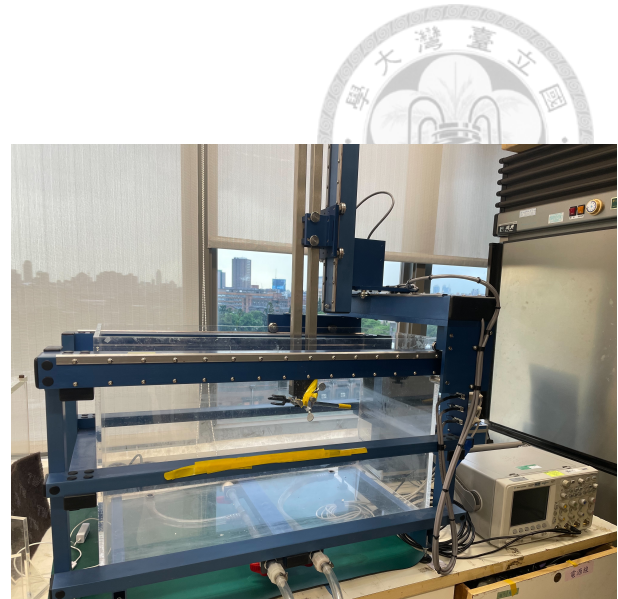
本研究所使用之 FUS 參數，詳表 2.5。對於小型動物模型的超音波施打實驗，焦點處的峰值負壓 (peak pressure) 強度範圍從 0-0.42 MPa (考慮到 40% 的穿顱損失後的自由場測得的壓力水平)，這相當於 MI 值從 0 到 0.25。FUS 參數設定為脈波重複頻率 (Pulse Repetition Frequency, PRF) 為 100 Hz，總施打時間為 600 秒，工作週期 (Duty Cycle, DC) 設置為 30%。超聲波施打強度 (Intensity, I) 定義為空間峰值時間平均 (Spatial-Peak Temporal-Average Intensity, 表示為 I_{spta} ，計算方式為 $I_{spta} = DC * P^2 / 2\rho c$)，其中 ρ 是腦組織密度， c 是聲速)。相關 FUS 參數的圖示說明，如圖 2.9，其中 BD 為 DC 中有施打超音波的時段，本研究為 3msec，BI 則為整個 DC 的時段，本研究為 10msec。

表 2.5 本研究 FUS 神經調控參數

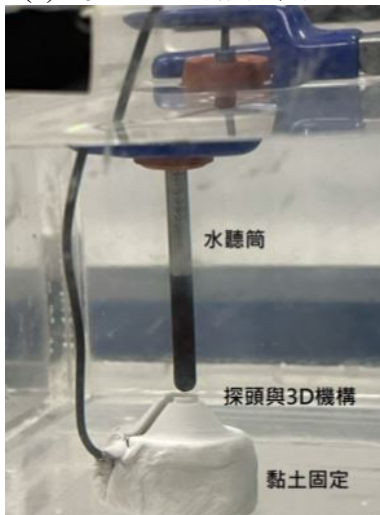
Parameter	number
Mechanical Index(MI)	0.25
Pulse Repetition Frequency(PRF)	100Hz
Duty Cycle(DC)	30%
Burst duration(BD)	3ms(3000cycle)
Burst interval(BI)	10ms
Protocol	30sec on, 90sec off
Total time(TT)	600sec
I_{spta}	0.728W



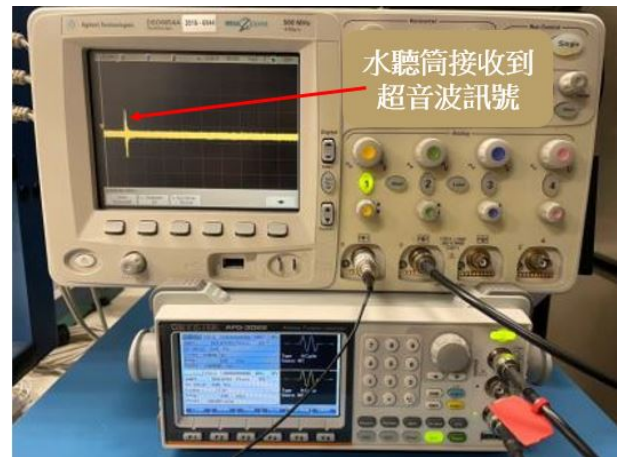
(a) 超音波探頭與圓錐形 3D 列印機構



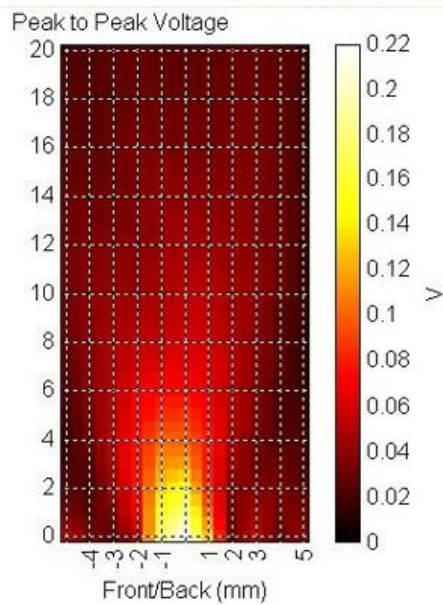
(b) 量測聲場用三軸定位系統與丙烯酸水槽



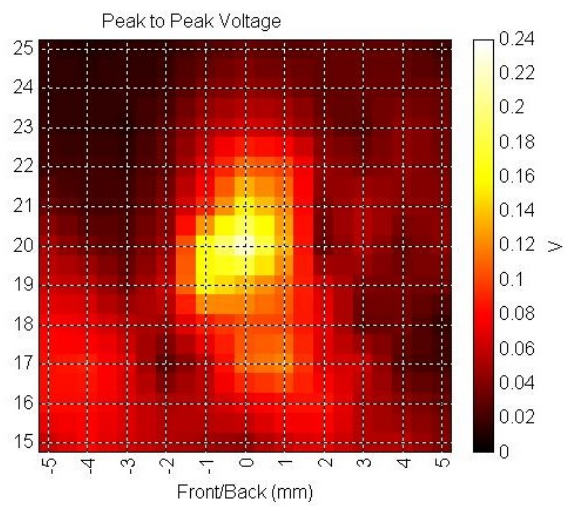
(c) 超音波探頭、機構與水聽筒設置



(d) 透過示波器確認水聽筒接收訊號



(e) 聲場焦點深度量測結果



(f) 聲場焦點中心量測結果

圖 2.7 聲場量測設置與量測結果



Mechanical index

$$MI = \frac{P_r}{\sqrt{f_c}}$$



圖 2.8 Mechanical Index 換算

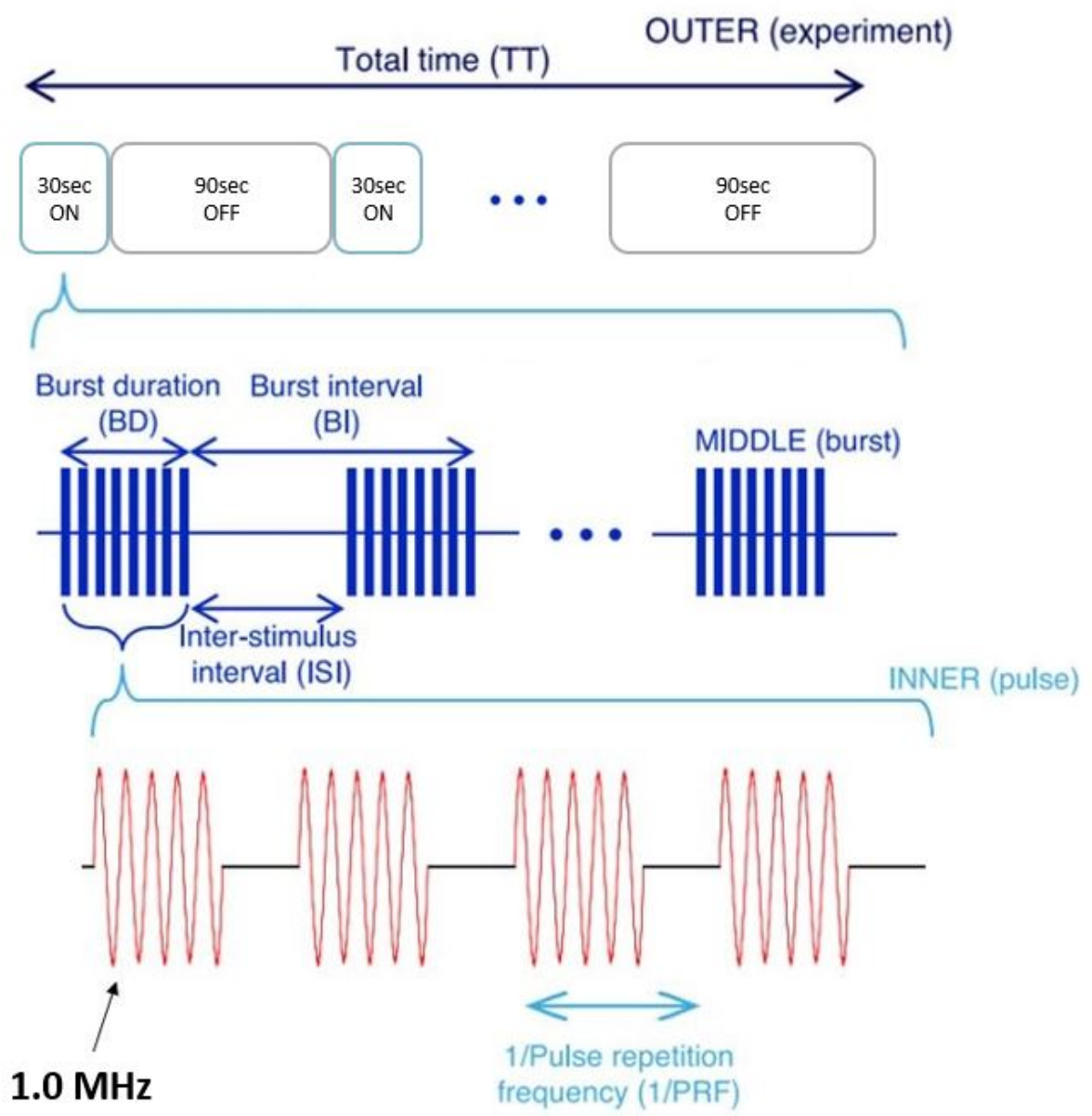


圖 2.9 FUS 參數說明



2.4 EEG 量測實驗

EEG 量測使用 4 通道電生理記錄系統 MP36 (BIOPAC System, California, USA), 如圖 2.10(a), 並配合 RS232 接頭與 MR 相容電極, 設計客製化 MR 相容電路系統, 如圖 2.10(b), 電路系統由黑色的 MR 相容電極接頭、訊號傳輸線、電路板與 24 個 MP36 母接頭組成。EEG 量測過程中全程使用 Sevoflurane 氣麻 (濃度 3%, 搭配混和氣 800ml/min), 為確保動物生命徵象, 在動物下方放置電熱毯以維持體溫, 並包覆錫箔紙隔絕雜訊, 如圖 2.11(b)。此外, 我們客製化一個用銅網包覆的法拉第箱 (faraday cage) 來隔絕外界雜訊如圖 2.11(a), 並將動物、法拉第箱、MP36 一起做接地; 使用法拉第箱前後的訊號如圖 2.11(c), 使用法拉第箱後, EEG 高頻雜訊明顯降低。MP36 接受 EEG 訊號之後, 系統會使用 60 Hz 的市電濾波器進行濾波處理並放大 (放大倍率為 1000), 並記錄為 raw EEG。

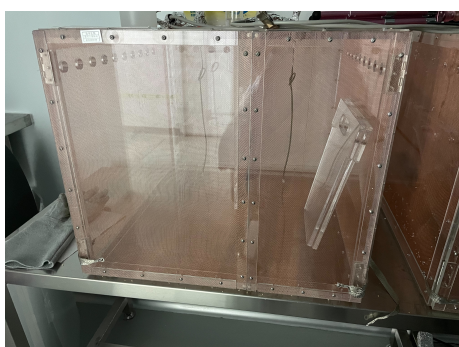


(a) 電生理記錄設備 MP36



(b) MR 相容電路系統

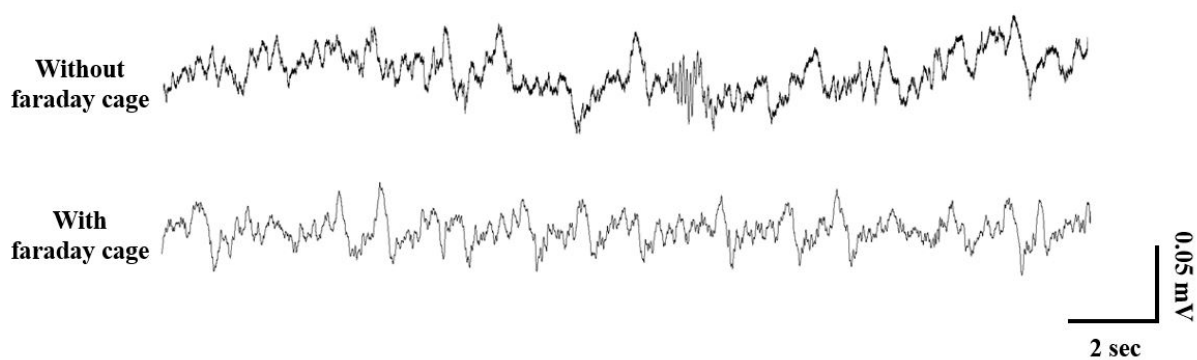
圖 2.10 EEG 量測系統



(a) EEG 實驗所使用法拉第箱



(b) 電極動物、探頭、保溫墊架設情形



(c) 量測 EEG，法拉第箱使用與否的比較

圖 2.11 量測 EEG 環境與動物架設情形

EEG 組實驗分為 Normal 組、PTZ(+)/FUS(-) 組、PTZ(+)/FUS(+) 組，各組實驗流程規劃如圖 2.12。Normal 組的動物不會進行 PTZ 注射或 FUS 施打，在氣體麻醉後記錄其 EEG 60 分鐘，作為與 PTZ(+)/FUS(-) 組、PTZ(+)/FUS(+) 組結果比較的 baseline；PTZ(+)/FUS(-) 組的動物在注射 PTZ 之前會先進行 20 分鐘的 EEG 記錄，完成後隨即進行 PTZ 腹腔注射，並記錄 EEG 60 分鐘；PTZ(+)/FUS(+) 組的動物會先進行 20 分鐘的 EEG 記錄，完成後隨即進行 PTZ 腹腔注射，並記錄 EEG 10 分鐘，緊接 10 分鐘的 FUS 施打，完成 FUS 後再記錄 40 分鐘。

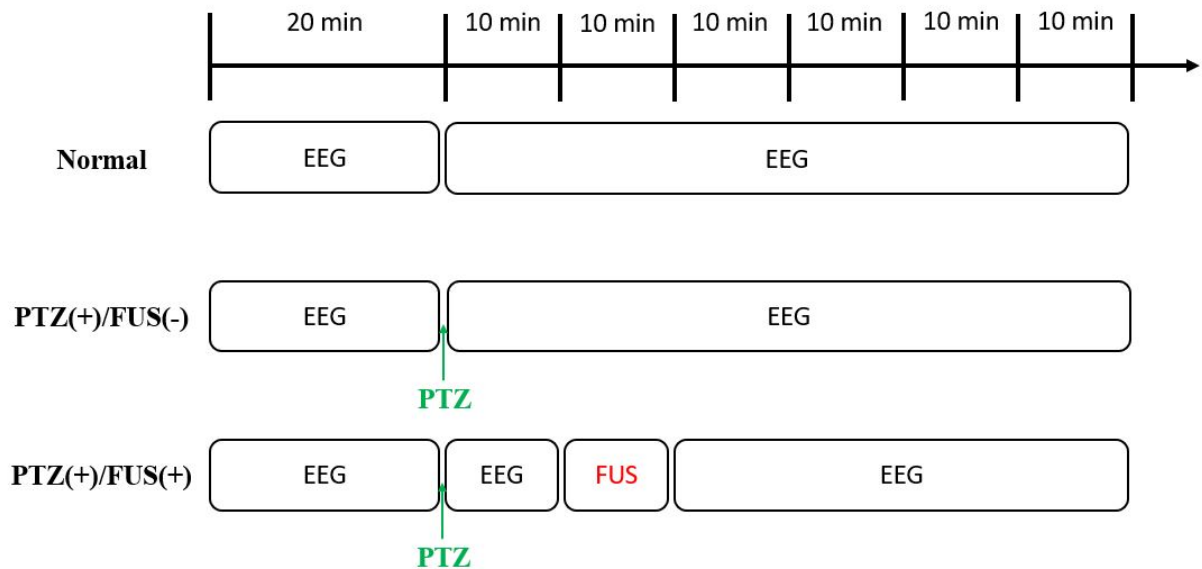


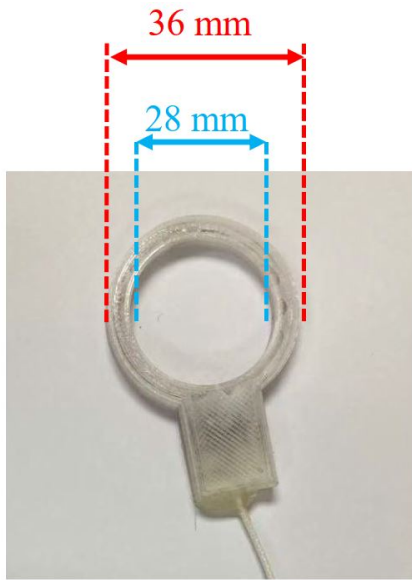
圖 2.12 EEG 分組實驗流程



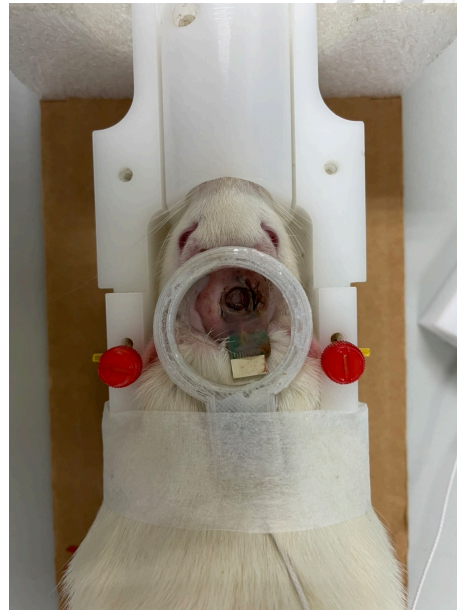
2.5 MRI 掃描實驗

MRI 掃描實驗使用 7 Tesla Bruker BioSpec MRI scanner (Bruker Corp., Billerica, MA, USA), 接收線圈使用 Bruker 客製化的單通道中空線圈, 如圖 2.13(a), 線圈架設在電極動物的情形如圖 2.13(b), 加上超音波探頭的情形如圖 2.13(c), 最後在 7T MRI 的實驗架設情形如圖 2.13(d)。所有 fMRI 數據都是使用 2D 平面回波成像 (Echo Planer Imaging, EPI) 序列所獲得的。序列參數如下: 3.0 x 3.0 cm 的 Field of View(FOV); 64x64x15 的成像矩陣; 0.5 x 0.5 x 1.0 mm 的解析度; 15 個切片 (slice), 切片間隔 (gap) 為 1.0 mm; TR(Repetition Time) = 1000ms; TE(Echo Time) = 20ms; 翻轉角度 (Flip Angle) = 90°; Repetition 500 次; 總掃描時間 8 分 20 秒。在 fMRI 運行之前, 使用 T2w RARE 序列獲取了一個結構影像 (0.5 x 0.5 x 1.0 mm 的分辨率; 15 個軸向 (axial) 切片, 無切片間隔; TR = 4000ms; TE = 42ms; NEX = 4; 總掃描時間 6 分 24 秒), 並使用 Bruker MAPSHIM 優化了磁場均勻性。

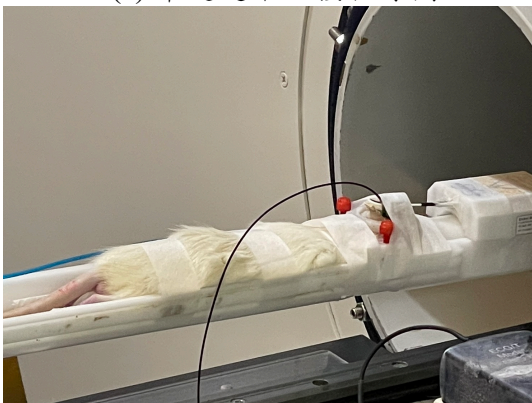
fMRI 組實驗分為 Normal 組、PTZ(+)/FUS(-) 組、PTZ(+)/FUS(+) 組, 各組實驗流程規劃如圖 2.14, 各組皆會先進行 T2 影像掃描對位與磁場勻場 (Shimming), 再依需求進行 fMRI 掃描, 每一組 fMRI 掃描時間約為 10 分鐘。Normal 組的動物不會進行 PTZ 注射或 FUS 施打, 在氣體麻醉後進行 6 組 fMRI 掃描 (共 60 分鐘), 作為與 PTZ(+)/FUS(-) 組、PTZ(+)/FUS(+) 組結果比較的 baseline; PTZ(+)/FUS(-) 組的動物在注射 PTZ 之前會先進行 2 組 fMRI 掃描 (共 20 分鐘), 完成後隨即進行 PTZ 腹腔注射, 並再進行 6 組 fMRI 掃描 (共 60 分鐘); PTZ(+)/FUS(+) 組的動物會先進行 2 組 fMRI 掃描 (共 20 分鐘), 完成後隨即進行 PTZ 腹腔注射, 並掃描 1 組 fMRI (共 10 分鐘), 緊接 10 分鐘的 FUS 施打, 完成 FUS 後再進行 4 組 fMRI 掃描 (共 40 分鐘)。



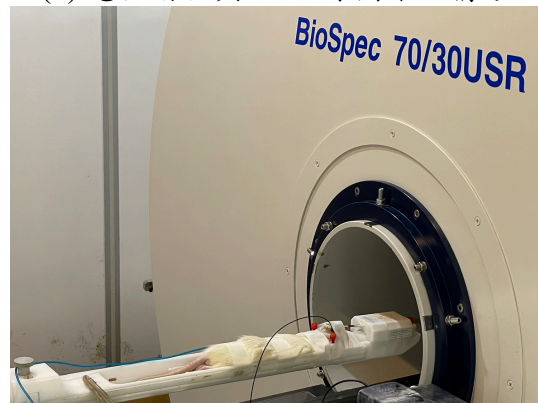
(a) 單通道中空接收線圈



(b) 電極動物與 MRI 線圈架設情形



(c) MRI 動物架設線圈與超音波探頭



(d) Bruker 7T MRI 動物架設

圖 2.13 MRI 量測系統

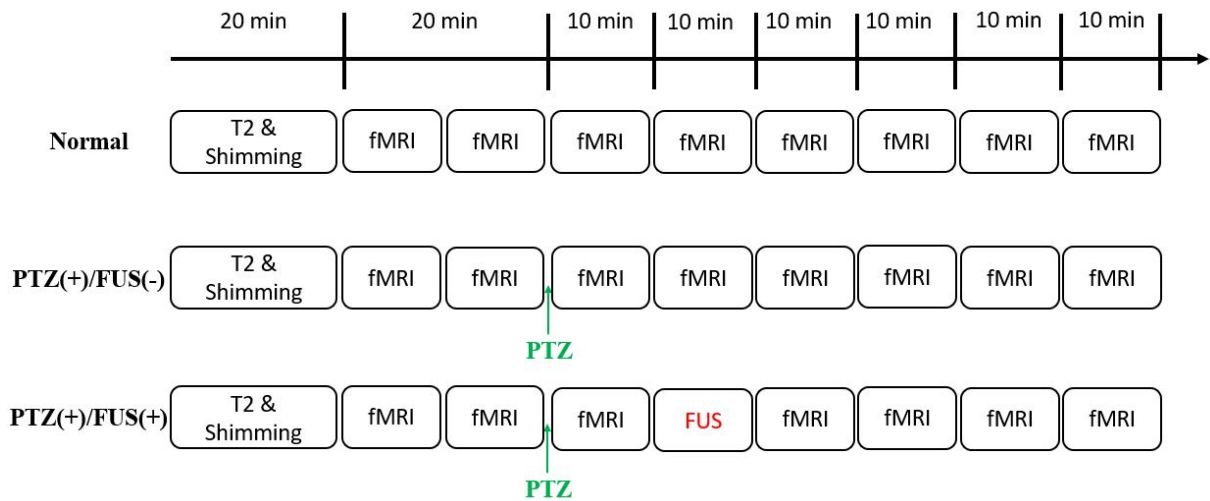


圖 2.14 fMRI 分組實驗流程



2.6 資料分析

2.6.1 fMRI 資料後處理

所有 fMRI 影像轉為 dicom 後，都先使用 dcm2niigui 執行檔 (Chris Rorden, 2011) 轉換成 Nifti 檔，接著使用 Matlab (R2022b, Mathworks, Natick, MA, USA) 的分析工具 SPM12 (SPM12, 2014) 進行前處理。使用 Valdes 的模板 [55]，對 T2 結構影像進行了分割。使用 SPM12，EPI 影像進行了對齊 (Realignment)，與結構影像進行了共同登錄 (Coregistration) 並規範化到模板空間，進行切片時間校正 (Slice Timing)，並使用 $0.8 \times 0.8 \times 0.8$ mm 的高斯濾波器進行空間的平滑化 (Smooth)。

1. 重新對齊 (Realignment)：

使用最小平方法和六個參數進行空間變換，對來自同一個受試者的時間序列圖像進行重新對齊。本研究使用 EPI 影像列表中的第一個圖像作為參考圖像，對所有後續掃描進行重新對齊，但參考掃描不必是時間上的第一張圖像，選擇一張”代表性掃描”作為參考也是可行。重新對齊主要目的是消除 fMRI 時間序列中的假影 (artifact)，對於每個輸入圖像，修改標頭以反映數據的相對方向。變換的細節將在結果 SPM 視窗中顯示為平移 (shift) 和旋轉 (rotation) 的圖表。對於每次重新對齊，將會保存一組重新對齊參數。在重新對齊之後，將圖像重塑，以便與選定的第一個圖像，逐個像素進行配對。

2. 共同登錄 (Coregistration)

使用 Valdes 模型和圖像重構，進行受試者內部的配準。這裡使用的配準方法基於 Collignon 等人的研究 [56]。為了使代價函數更加平滑，修改了該論文中描述的原始插值方法。圖像也略微平滑處理，直方圖也是如此，這一切都是為了使代價函數盡可能平滑，以實現更快的收斂速度並降低局部最小值的機會。在核心配準結束時，將顯示體積像素到體積像素仿射轉換矩陣，以

及原始方向和最終方向的圖像直方圖。已登錄的圖像顯示在底部。配準參數存儲在”source”和”other”圖像的標頭中。這些圖像也會被重新塑造，以體積像素對體積像素與 source 圖像匹配。



3. 切片時間校正 (Slice Timing) :

該函數校正切片採集時間的差異。此過程旨在糾正使用 EPI 掃描期間所使用的錯位切片採集順序，這種校正是為了使每個切片上的數據對應到相同的時間點。如果不進行校正，一個切片上的數據將代表與相鄰切片相距一半 TR 的時間點（對應到錯位切片採集順序）。為了更清楚地理解這一點，考慮同時在兩個相鄰切片上發生的神經事件（以及隨之而來的血氧水平反應）。從時間零開始，同時採集來自切片“A”的數據，與神經事件同步，而來自切片“B”的數據則在一秒鐘後採集。如果不進行校正，”B”上的數據將描述血氧水平反應開始時間比切片”A”上早一秒鐘。為了糾正這一點，需要將”B”上的數據向右移位，即朝最後一個值的方向移動。該過程將信號在時間上“平移”，以提供表示相同（連續）信號的輸出向量，該信號在起始時間上進行取樣，這是通過改變構成信號的正弦波的相位來實現的。由於傅立葉變換可以將任何信號表示為不同頻率和相位的正弦波的線性組合，故將在每個頻率的相位上添加一個常數，以使數據在時間上進行移位，在時間域中，它可以描述為已經根據 TimeShift 進行了時間移位的脈衝（delta 函數）。該校正通過使用 sinc 差值將每個切片上的時間序列數據向前移動，從而使每個時間序列的值與參考切片，在同一時間點上獲得的值相對應。在使用切片時間校正時，非常重要是輸入正確的切片順序，如果有任何不確定性，建議與 MRI 專家合作確定實際的切片採集順序。

4. 平滑 (Smooth) :

使用指定寬度的高斯核對影像進行，它作為預處理步驟用於降低雜訊並抑制在跨受試者平均期間由於功能和腦迴路解剖的殘差差異引起的影響。

完成 SPM 前處理之後，再使用 Matlab 程式 RESTplus 進行後處理，進一步對數據進行時間濾波（使用帶通濾波器，頻率範圍為 0.01 至 0.08 Hz），將從對齊過程中的運動校正時間序列進行回歸處理，並且還回歸處理了平均信號，接著藉由 MRICron 自定義的 view of interest(VOI) 去得出後處理完成的 Nifti 檔案。最後，透過 Mango 將處理結果 Nifit 檔，疊加在 T2 影像上觀察 fMRI 實驗結果，處理流程如圖 2.15。

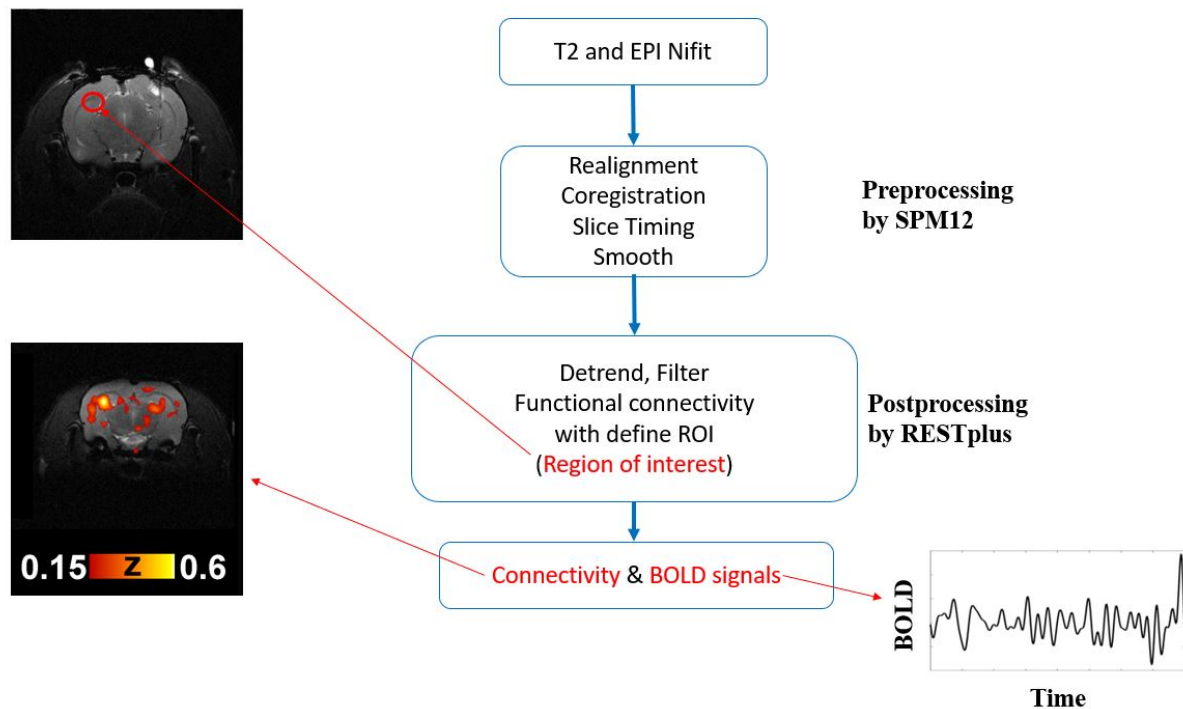



圖 2.15 fMRI 資料分析，使用 SPM 前處理與 Restplus 後處理

基於大鼠腦部 T2 影像，Todd 等人創建了一組解剖腦區，如圖 2.16，這些區域是根據 McDannold 小組的研究 [2]，該研究參考了 Paxinos 和 Watson 的大鼠腦圖譜 [53]。總共有 18 個腦區域，左右兩側腦共計 36 個 Region of interest(ROI)，包括左右兩側，如圖 2.16：海馬迴 (Hippocampus, Hippo.)、視丘 (Thalamus, Thal.) 視丘腹後內/外側核 (the ventral posteromedial and ventral posterolateral thalamic nuclei, VPM/VPL)、主視覺皮質 (primary visual cortex, V1)、次級視覺皮質外側區 (secondary visual cortex lateral area, V2L)、次級視覺皮質內側區 (secondary visual cortex medial area, V2M)、主聽覺皮質 (primary auditory cortex, Au1)、視床外



側和後側區域 (the lateral and posterior areas of the hypothalamus, Hypo Thal)、主體感覺皮質幹區 (primary somatosensory cortex trunk region, S1Tr)、主體感覺皮質桶區 (primary somatosensory cortex barrel field, S1BF)、主體感覺皮質後肢區 (primary somatosensory cortex hind limb region, S1HL)、主體感覺皮層前肢區 (primary somatosensory cortex front limb region, S1FL)、次級體感覺皮質 (secondary somatosensory cortex, S2)、主體感覺皮質顎區 (primary somatosensory cortex jaw region, S1J)、主運動皮質 (primary motor cortex, M1)、島葉皮質 (insular cortex, Ins)、尾狀核豆狀區 (caudate putamen, CPu)、顳葉後回顆粒區 (retrosplenial cortex granular, RSC) 和扣帶皮質 (cingulate cortex, Cg)。

根據 36 個定義的腦部區域的信號時間序列，我們提取了這些腦部區域的 BOLD 信號強度。每個信號時間序列與其他信號時間序列配對，並計算它們之間的功能連結性，這是基於皮爾遜 (Pearson) 相關係數計算的 [2]。最後用自訂義的 Matlab 程式，得出 36 個腦區之間皮爾遜相關係數 (Correlation Coefficient, C.C.) 大小的矩陣，即為功能性連結矩陣 (Functional Connectivity matrix)，針對腦區與腦區間的功能性連結相關係數，以顏色區份數值高低，矩陣本身成倒三角形對稱，如圖 2.17。最後，將全腦區的 C.C. 做數量分布的統計，並針對巴貝茲迴路相關腦區 Hippo.、Thal.、VPM/VPL 去做進一步統計分析。

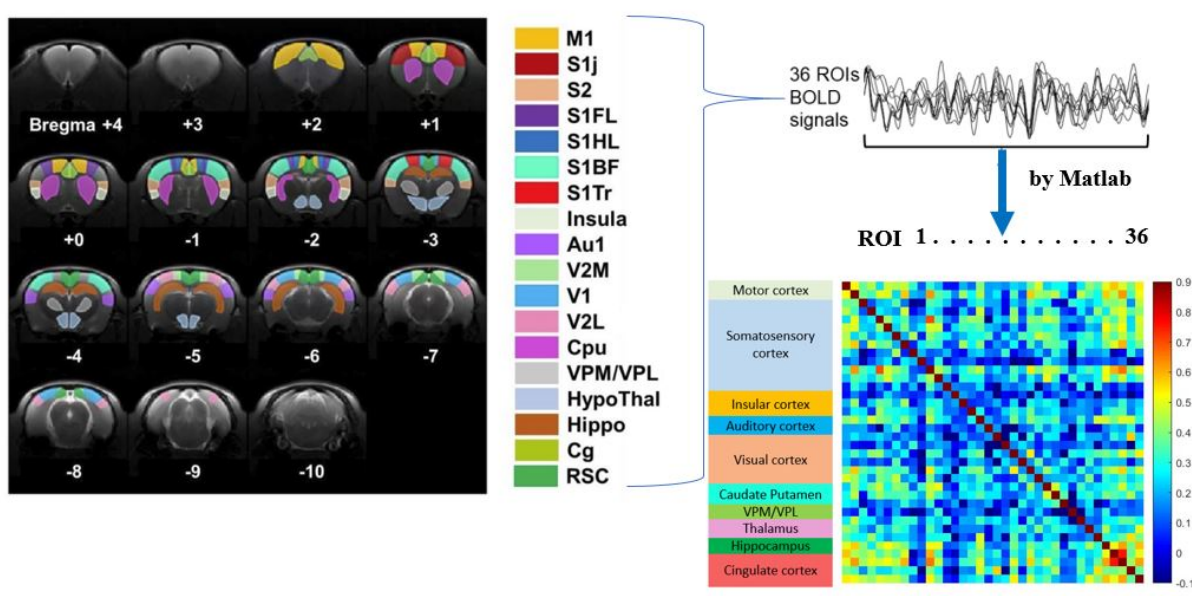


圖 2.16 fMRI 資料後處理，提取 36 個腦區 (左右腦各 18 個) 的 BOLD 訊號得出功能性連結矩陣 [2]

resting state fMRI Connectivity map

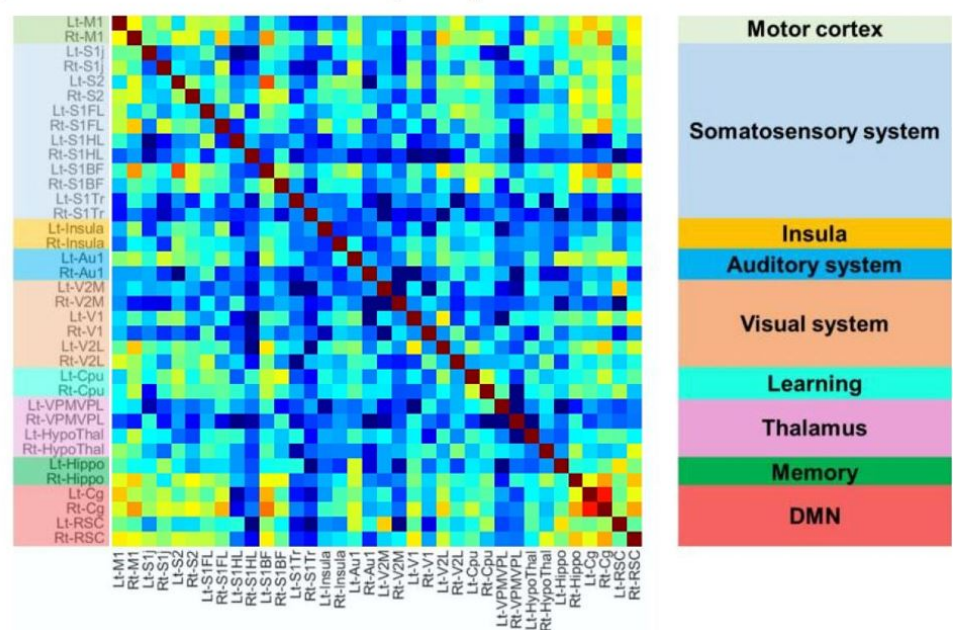


圖 2.17 fMRI 功能性連結矩陣各腦區與網路說明 [2]



2.6.2 EEG 資料後處理

對於癲癇尖波的分析，方法為對 EEG 進行了頻譜分析，在整個頻譜（1-250 Hz）使用帶通濾波器進行濾波，產出包括 alpha 波（8-13 Hz）、beta 波（13-30 Hz）、theta 波（4-8 Hz）和 gamma 波（30-80 Hz），對應癲癇的過往研究，本研究採用 theta 波進行後續分析 [33]。在使用 PTZ 注射並接受或未接受聚焦式超音波治療的大鼠中，通過在 AcqKnowledge 4.2（BIOPAC System，California, USA）中優化的自動癲癇檢測算法來計算每個時間段中的癲癇尖波 (spike)，尖波被定義為持續 40 至 60 毫秒的幅度超過背景活動 3 倍以上的標準差。頻譜分析後，針對 theta 波評斷利用軟體功能 local spike episodes 進行尖波位置標定，如圖 2.18，並計算尖波數量與出現時間點，最後製成尖波數量對比時間之折線圖，用以比較 EEG 實驗 Normal 組、PTZ(+)/FUS(-) 組、PTZ(+)/FUS(+) 組，在尖波數量上比較癲癇發作的趨勢改變。

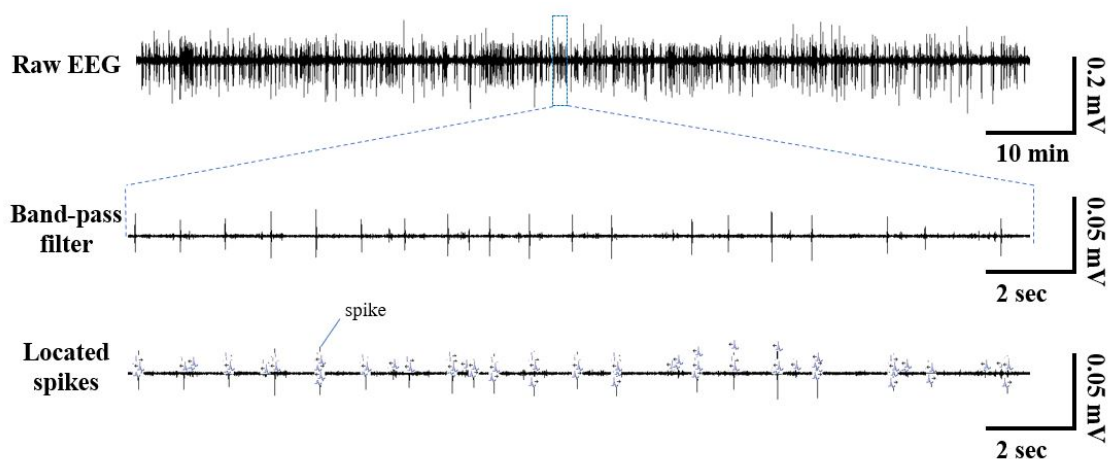


圖 2.18 EEG 資料後處理，spike 數量累計



2.7 統計分析

本研究設計幾個指標做為評估標準，根據對此系統所能達到的預期成果來做數據處理。統計分析使用 Microsoft Excel 進行，應用重複測量方差分析對尖波累積量與功能連結性相關係數 C.C. 進行分析。

針對 fMRI 組，實驗分為 Normal 組、PTZ(+)/FUS(-) 組、PTZ(+)/FUS(+) 組。經過 SPM12 前處理與 RESTplus 後處理，我們得到 BOLD map 與功能性連結矩陣，以每 10 分鐘的變化。針對巴貝茲迴路的相關腦區做分析，我們擷取 Hippo.、Thal. 以及 VPM/VPL 三個腦區，倆倆腦區的功能性連結 C.C.，進行後續的統計分析。使用最小顯著差異事後分析，顯著性水平設定為 $0.05(p < 0.05)$ ，數據以平均值 ± 標準差的形式呈現，再採用雙尾/配對的 t-test(2-tailed/paired Student's t-test)，顯著性水平設定為 $0.05(p < 0.05)$ 。t-test 所採用的兩組分別為 Normal 組、PTZ(+)/FUS(-) 組，比較注射 PTZ 之前與之後的顯著差異；也會比較 PTZ(+)/FUS(-) 組、PTZ(+)/FUS(+) 組，比較 FUS 介入之前與之後的顯著差異。

針對 EEG 組，實驗分為 Normal 組、PTZ(+)/FUS(-) 組、PTZ(+)/FUS(+) 組。電極植入位置為海馬迴，巴貝茲迴路的腦區之一。首先我們想看到 PTZ 誘發癲癇的結果，故在 PTZ 注射後每 10 分鐘進行 spike 數量計算，並進行後續的統計分析；10 分鐘的統計也可對應 fMRI 的分析結果做比較與討論。使用最小顯著差異事後分析，顯著性水平設定為 $0.05(p < 0.05)$ ，數據以平均值 ± 標準差的形式呈現，再採用 2-tailed/paired Student's t-test，顯著性水平設定為 $0.05(p < 0.05)$ 。t-test 所採用的兩組分別為 Normal 組、PTZ(+)/FUS(-) 組，比較注射 PTZ 之前與之後的顯著差異；也會比較 PTZ(+)/FUS(-) 組、PTZ(+)/FUS(+) 組，比較 FUS 介入之前與之後的顯著差異。



第三章 實驗結果

3.1 藥物誘發癲癇動物 EEG 結果

完成手術的動物會先進行 EEG 記錄，作為後續比較的 baseline。在腹腔注射 PTZ 後，所有的動物在 EEG 觀測上，都有呈現尖波增加的趨勢，如圖 3.1。為了找到最適合本研究的 PTZ 注射劑量，我們針對不同的動物進行一次注射 PTZ 後量測 EEG 60 分鐘的實驗，劑量分別為 40 mg/kg、50 mg/kg、60 mg/kg、70 mg/kg，並每 10 分鐘統計每一項數據的尖波數量，結果如圖 3.2。可觀察到在 40-60mg/kg 劑量的 EEG 記錄中，尖波數量在注射後的 10 分鐘內有顯著上升，但 10 分鐘後尖波數量有下降的趨勢；在 70mg/kg 劑量的 EEG 實驗中，不同的動物存在個體差異，有些動物在注射後的 10 分鐘內有顯著上升，但 10 分鐘後尖波數量有下降的趨勢，有些動物則可以維持較久的尖波數量，甚至到 60 分鐘都沒有下降的趨勢。PTZ 劑量 70mg/kg 在尖波數量的延續表現上最為顯著，因為後續的超音波抑制癲癇實驗，我們希望觀察到尖波數量的降低，是因為超音波治療的效應，而不是因為藥物本身的藥效衰退，故選擇劑量 70mg/kg 作為後續 EEG 實驗 PTZ(+)/FUS(-) 組、PTZ(+)/FUS(+) 組，以及 fMRI 實驗組 PTZ(+)/FUS(-) 組、PTZ(+)/FUS(+) 組所使用的劑量。

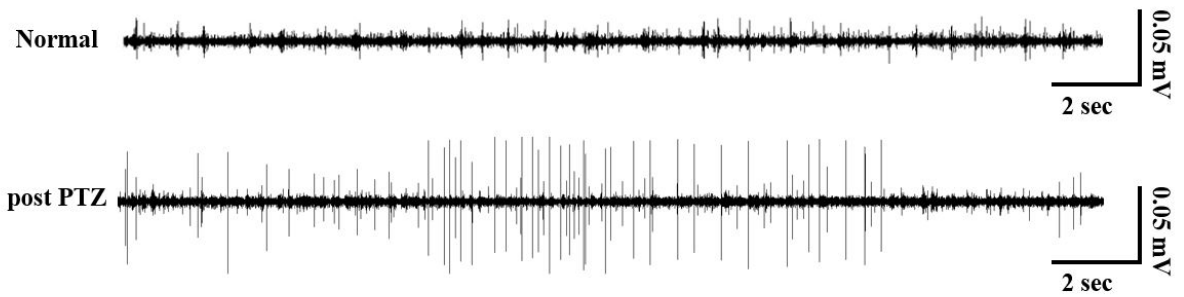


圖 3.1 比較 Normal 組動物的 EEG，注射 PTZ 誘發癲癇的動物，在 EEG 上有尖波數量增加的趨勢

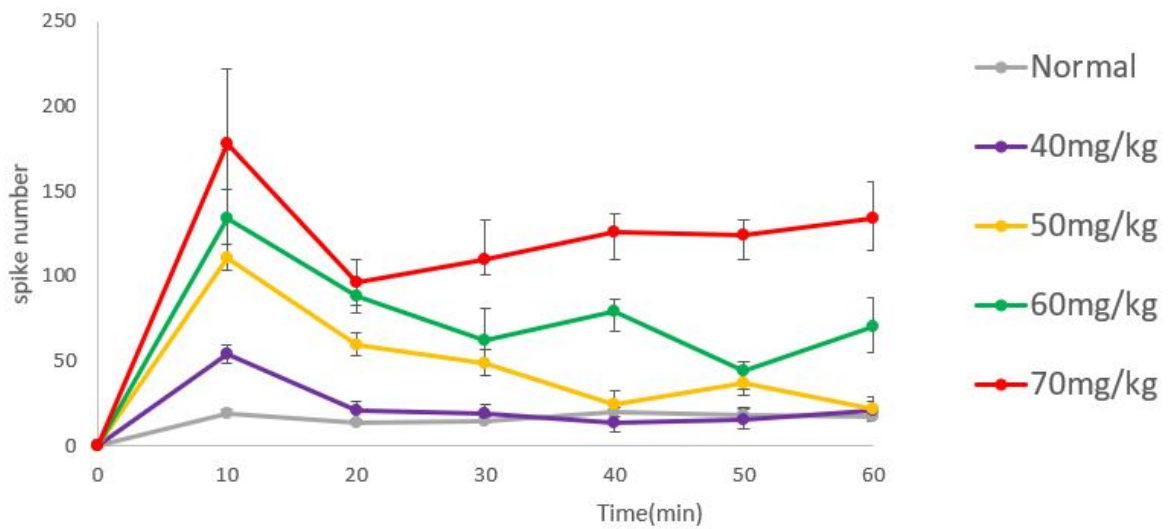


圖 3.2 注射 4 種不同劑量的 PTZ 誘發癲癇，每種劑量所對應 EEG 的尖波數量。劑量 70mg/kg 在 60 分鐘內可維持相對較高的尖波數量，故將其作為後續實驗的使用劑量

3.2 超音波治療後藥物誘發癲癇動物 EEG 結果

從 EEG 波型上看實驗結果如圖 3.3。PTZ(+)/FUS(-) 組，在記錄 20 分鐘的 EEG 作為 baseline 後，對動物進行 PTZ 腹腔注射，並開始進行 60 分鐘的 EEG 記錄；PTZ(+)/FUS(+) 組，為了在同一次實驗觀察 PTZ 誘發癲癇與 FUS 抑制癲癇的成果，在 PTZ 注射後先記錄 10 分鐘的 EEG，再進行 FUS 10 分鐘施打，完成 FUS 之後再進行 40 分鐘的 EEG 記錄。FUS 施打期間由於功率放大器造成的雜訊過大，故無法量測可分析的 EEG。可看到對比只注射 PTZ 的組別，在 FUS 施打後 spike 的發生頻率有減少的趨勢。經過軟體後處理後尖波數量累計如圖 3.4，兩張圖對應兩隻不同動物的實驗結果。其中黑線是 PTZ(+)/FUS(-) 組的 spike 數量，在時間點 0 分鐘 (0 min) 時進行 PTZ 腹腔注射；紅線是 PTZ(+)/FUS(+) 組的 spike 數量，同樣在時間點 0 分鐘時進行 PTZ 腹腔注射，並記錄 EEG 10 分後，灰色區塊為 10 分鐘的 FUS 施打，完成 FUS 之後再進行 40 分鐘的 EEG 記錄。

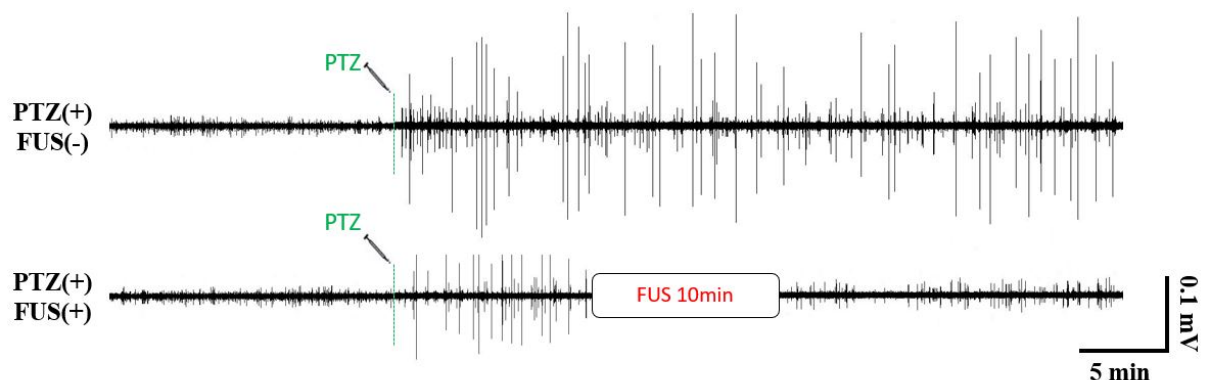


圖 3.3 超音波治療癲癇動物 EEG 結果。對比只注射癲癇藥物的 PTZ(+)/FUS(-) 組，PTZ(+)/FUS(+) 組在 FUS 施打後，spike 的數量有減少的趨勢

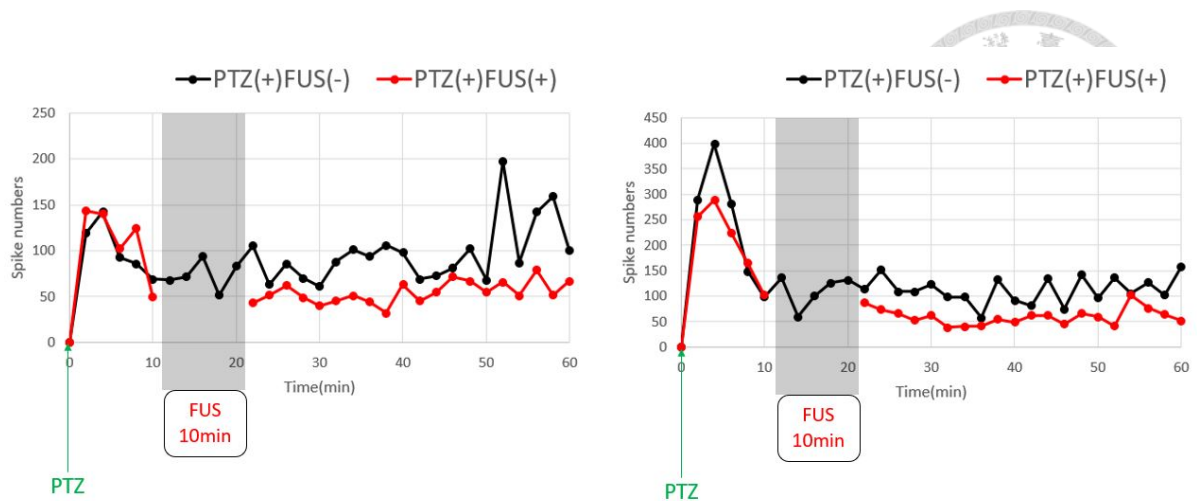
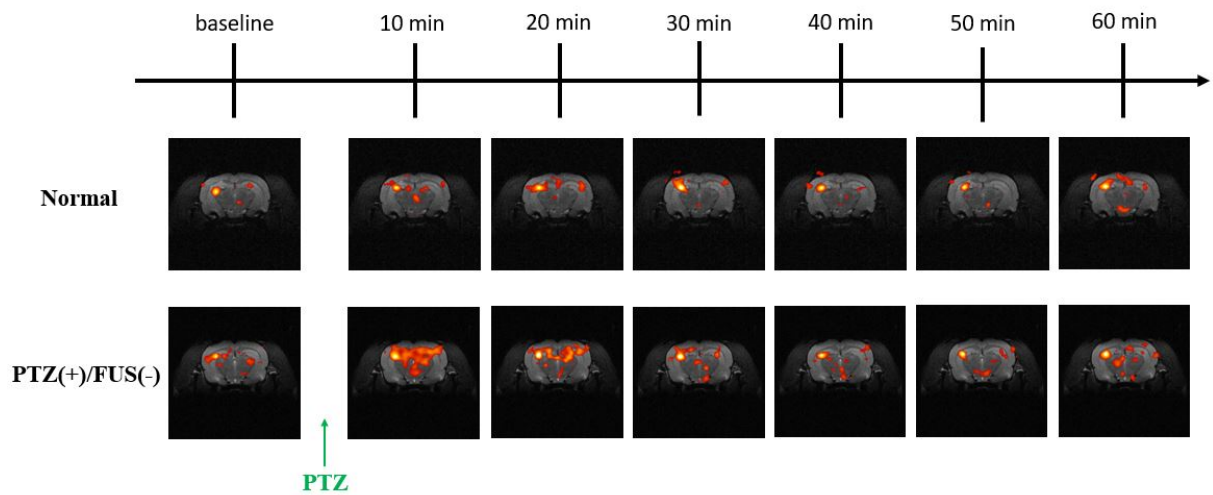


圖 3.4 PTZ(+)/FUS(+) 組中兩隻動物的 EEG 尖波數量隨時間變化表，尖波數量每兩分鐘進行一次累計。對比只注射癲癇藥物的組別 (黑線)，超音波治療組別 (紅線) 的尖波數量明顯下降

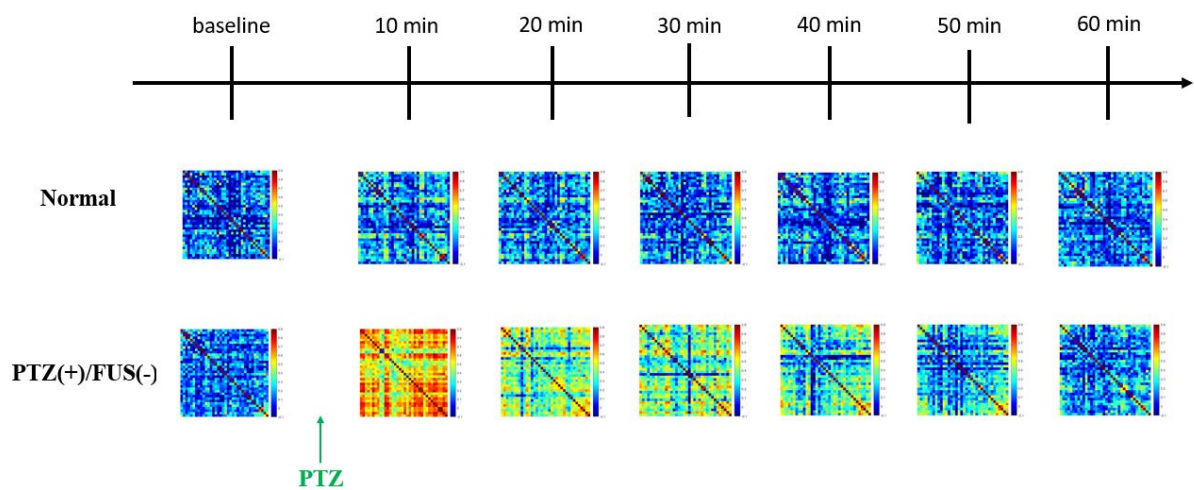
3.3 藥物誘發癲癇動物 fMRI 結果

完成手術的 Normal 組動物會進行 6 組 fMRI 掃描，作為後續比較的 baseline。fMRI 實驗 PTZ(+)/FUS(-) 組，動物先麻醉並上架後，會先進行 T2 影像對位與磁場勻場，並進行兩次 fMRI 掃描作為比對基準 baseline。之後在動物不下架的情況下進行 PTZ 腹腔注射，並立即進行後續 6 組的 fMRI 掃描。實驗檔案經過 SPM 前處理與 RESTplus 後處理後，BOLD map 結果如圖 3.5(a)，seed 位置在左側海馬迴，可觀察到 Normal 組 60 分鐘內的 6 組影像，與海馬迴有較明顯功能性連結的區域 (影像中紅白色的區域)，大多在左側海馬迴周遭；對比 Normal 組，PTZ(+)/FUS(-) 組在注射 PTZ 之後，在皮層、右側海馬迴、視丘等腦區，功能性連結的區域面積皆有顯著上升；功能性連結矩陣的結果如圖 3.5(b)，可看出對比 Normal 組 60 分鐘內的 6 組矩陣，PTZ(+)/FUS(-) 組在注射 PTZ 之後，顏色由偏青藍色變成偏棕紅色，代表功能性連結 C.C. 有上升趨勢。

Normal 組的 4 隻動物 FC 矩陣結果如圖 3.6，可觀察 4 隻動物在 60 分鐘內的矩陣皆為青藍色，代表功能性連結改變不大，但每隻動物會有個體差異；PTZ(+)/FUS(-) 組的 6 隻動物 FC 矩陣結果如圖 3.7，在注射 PTZ 之後，顏色由青藍色變成



(a) Normal 組與 PTZ(+)/FUS(-) 組動物 BOLD map 結果，seed 位置在左側海馬迴



(b) Normal 組與 PTZ(+)/FUS(-) 組動物 FC 矩陣結果

圖 3.5 fMRI 實驗 Normal 組與 PTZ(+)/FUS(-) 組動物實驗結果。(a) 在注射 PTZ 後，在皮層、右側海馬迴、視丘等腦區，訊號強度皆有顯著上升 (呈現紅白色)。(b) 在注射 PTZ 後，顏色由偏青藍色變成偏棕紅色，代表大部分腦區與腦區間的功能性連結有上升趨勢

棕紅色，代表大部分腦區與腦區間的功能性連結 C.C.，其數值皆有上升。

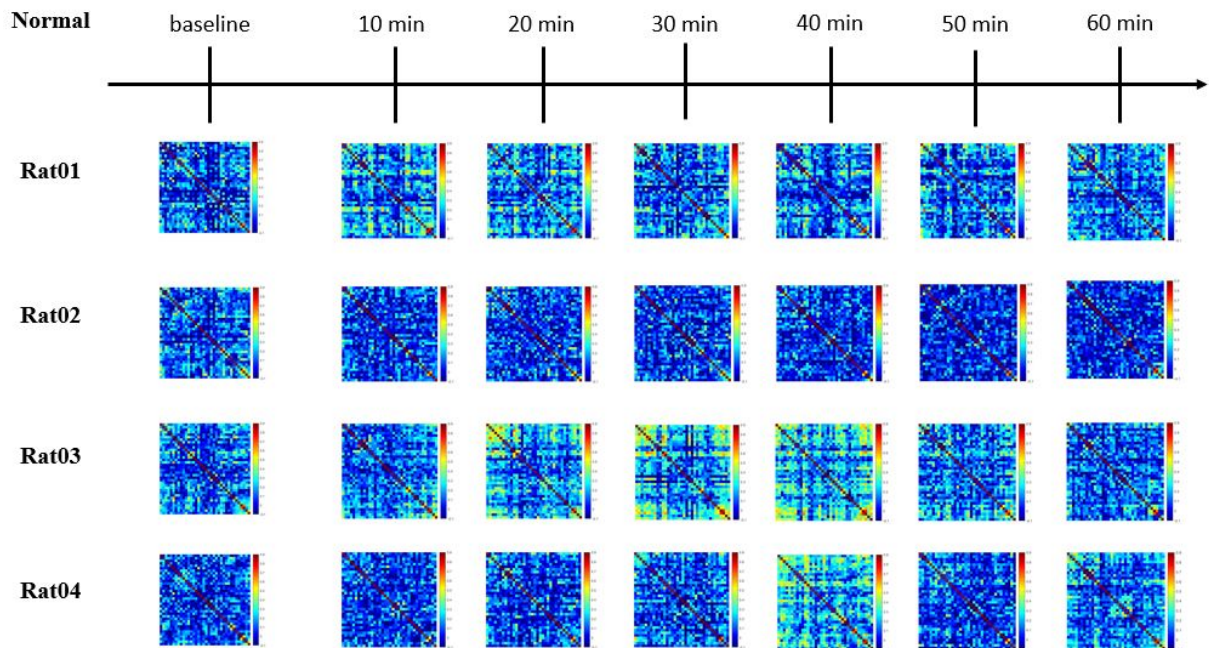


圖 3.6 fMRI 實驗 Normal 組的 4 隻動物的 FC 矩陣。可觀察 4 隻動物在 60 分鐘內的矩陣皆為青藍色，代表功能性連結改變不大，但每隻動物會有個體差異

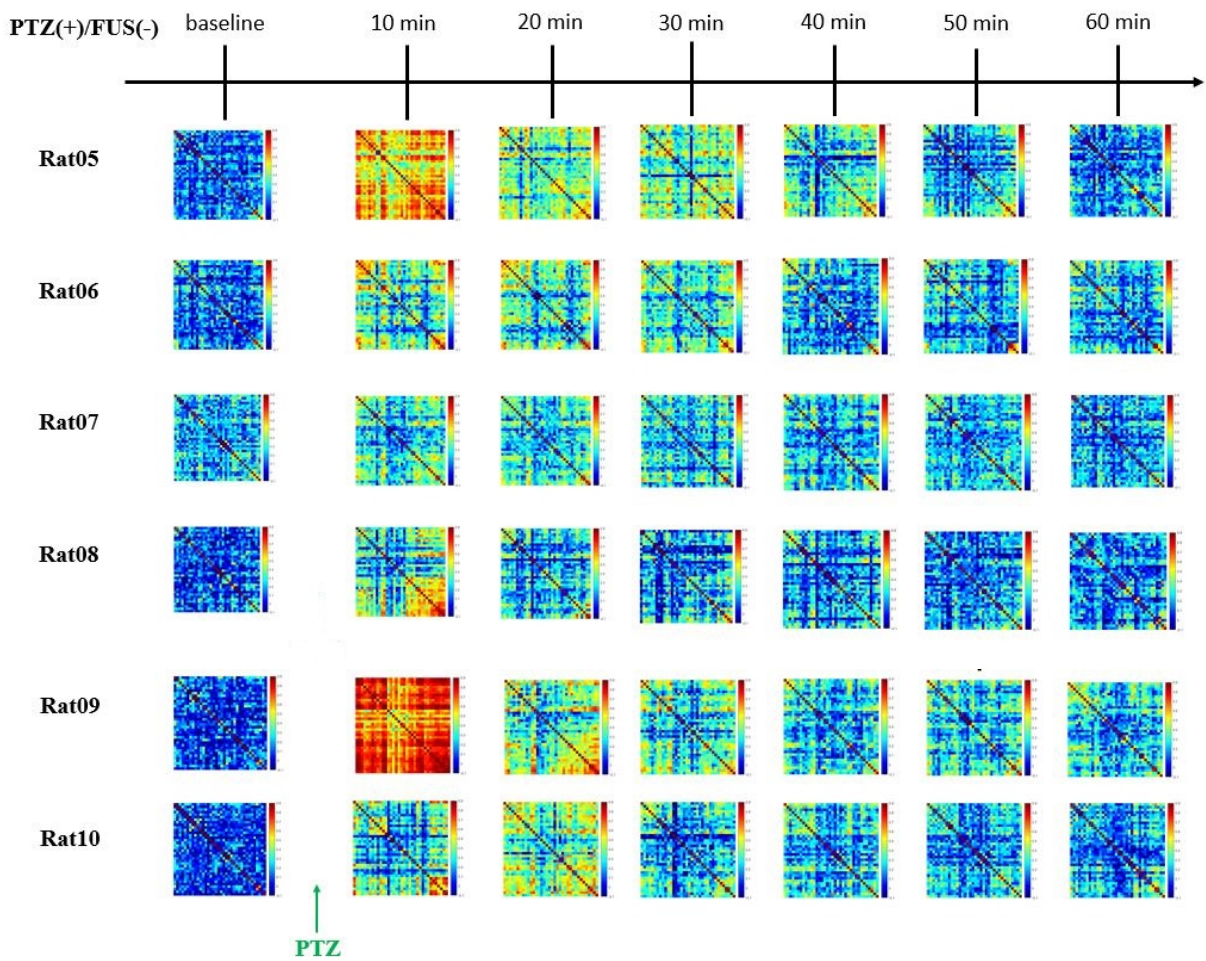


圖 3.7 fMRI 實驗 PTZ(+)/FUS(-) 組 6 隻動物的 FC 矩陣。在注射 PTZ 之後，顏色由青藍色變成棕紅色，代表腦區與腦區間的功能性連結 C.C.，數值皆有上升趨勢

藉由功能性連結矩陣中的相關係數 (correlation coefficient, C.C.) 的分布 Histogram，以每 0.05 為間隔統計出各區間的數量，可看見 PTZ 注射後的數量分布改變，取 PTZ(+)/FUS(-) 組的 Rat05 為例，C.C. 數量分布 Histogram 結果如圖 3.8，。baseline 的 C.C. 分布主要在 -0.1 至 0.50，平均值為 0.19，如圖 3.9，；施打 PTZ 後 10 分鐘分布在 0.25-0.9，平均值為 0.65，如圖 3.10；施打 PTZ 後 20 分鐘分布在 0.0-0.75，平均值為 0.54，如圖 3.11；施打 PTZ 後 30 分鐘分布在 -0.1-0.75，平均值為 0.51，如圖 3.12；施打 PTZ 後 40 分鐘分布在 -0.1-0.7，平均值為 0.43，如圖 3.13；施打 PTZ 後 50 分鐘分布在 -0.1-0.7，平均值為 0.32，如圖 3.14；施打 PTZ 後 60 分鐘分布在 -0.1-0.55，平均值為 0.28，如圖 3.15。

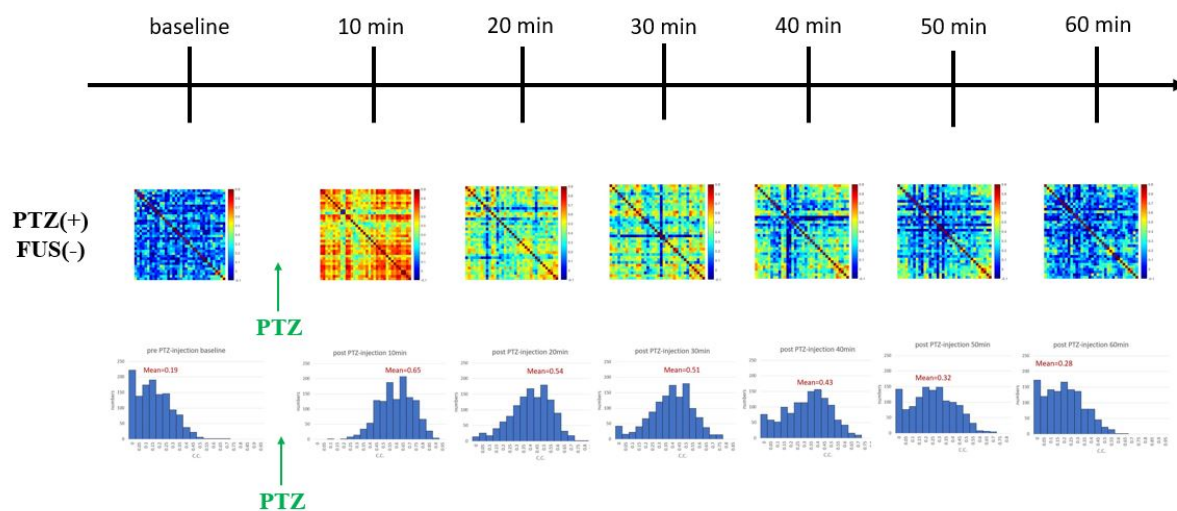


圖 3.8 fMRI 實驗 PTZ(+)/FUS(-) 組動物實驗結果 C.C. 分布 Histogram。對比藥物注射前的 C.C. 平均值 0.19，注射後 10 分鐘平均值上升至 0.65，隨時間下降至注射後 60 分鐘的 0.28

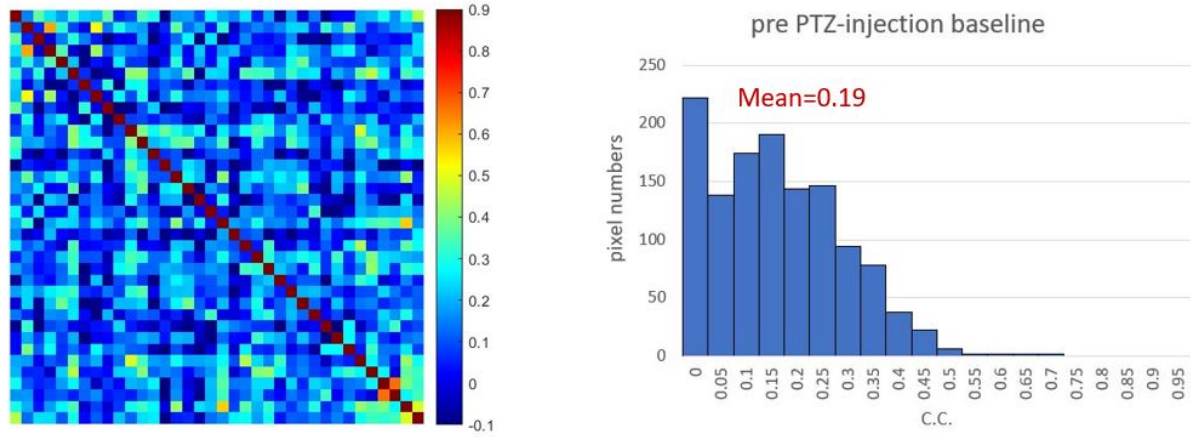


圖 3.9 fMRI 實驗 PTZ(+)/FUS(-) 組動物實驗結果，PTZ 注射前 FC 矩陣與 C.C. 分布 Histogram，C.C. 平均值為 0.19

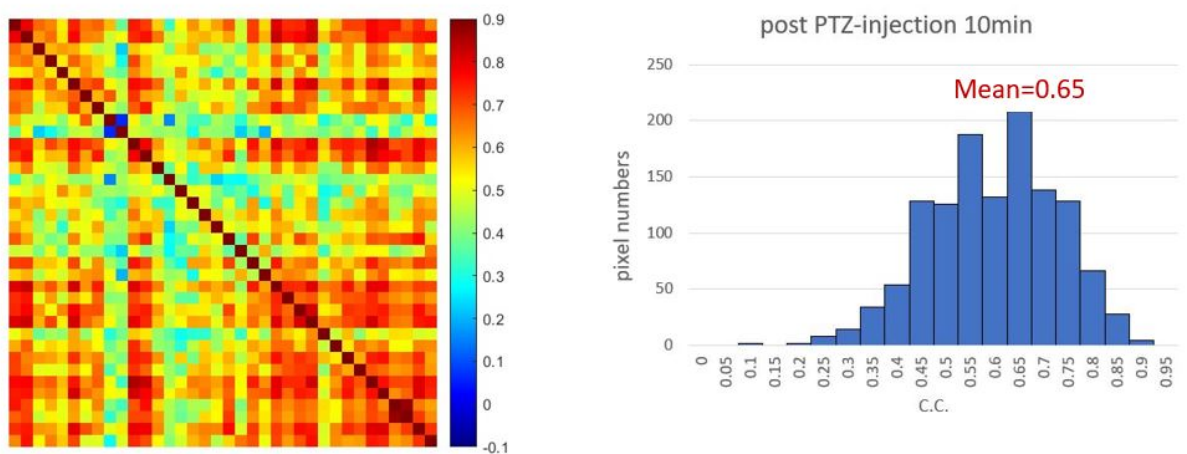


圖 3.10 fMRI 實驗 PTZ(+)/FUS(-) 組動物實驗結果，PTZ 注射後 10 分鐘 FC 矩陣與 C.C. 分布 Histogram，C.C. 平均值為 0.65

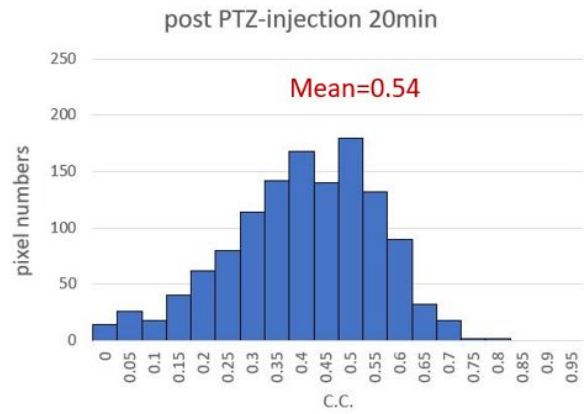
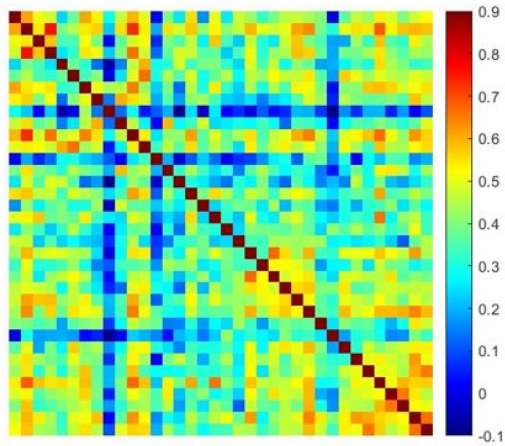


圖 3.11 fMRI 實驗 PTZ(+)/FUS(-) 組動物實驗結果，PTZ 注射後 20 分鐘 FC 矩陣與 C.C. 分布 Histogram，C.C. 平均值為 0.54

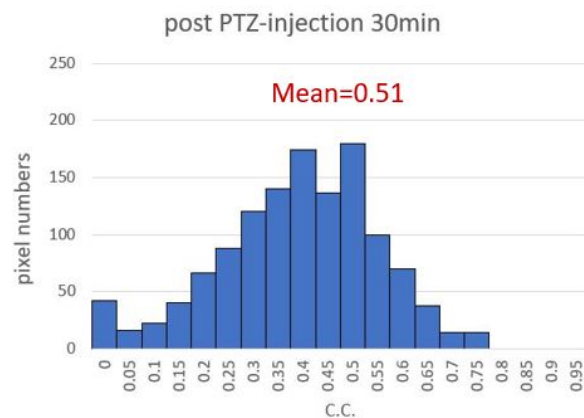
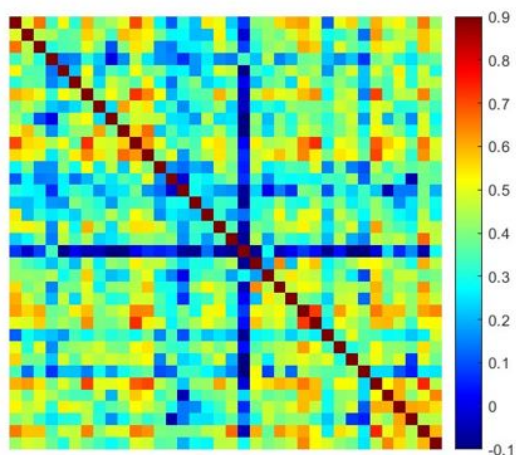


圖 3.12 fMRI 實驗 PTZ(+)/FUS(-) 組動物實驗結果，PTZ 注射後 30 分鐘 FC 矩陣與 C.C. 分布 Histogram，C.C. 平均值為 0.51

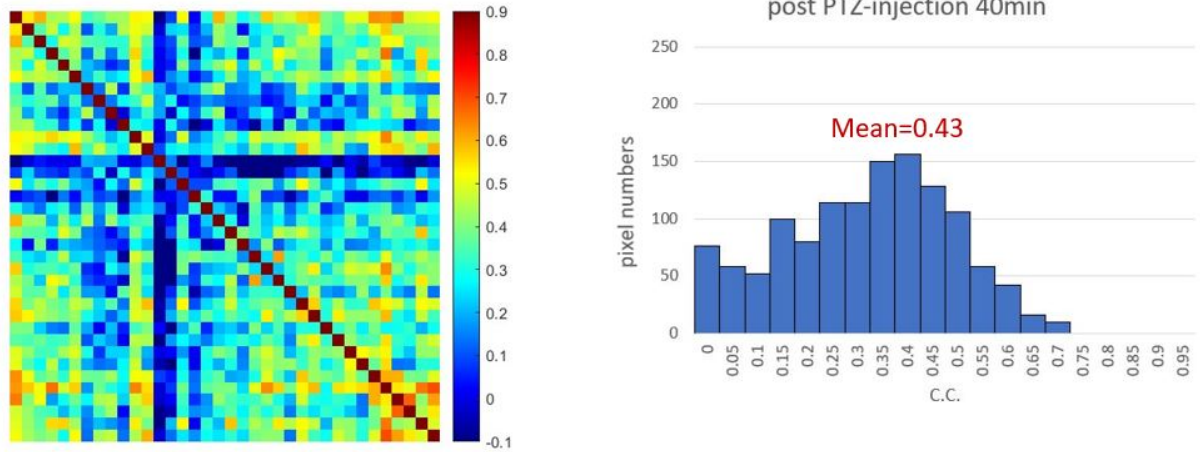


圖 3.13 fMRI 實驗 PTZ(+)/FUS(-) 組動物實驗結果，PTZ 注射後 40 分鐘 FC 矩陣與 C.C. 分布 Histogram，C.C. 平均值為 0.43

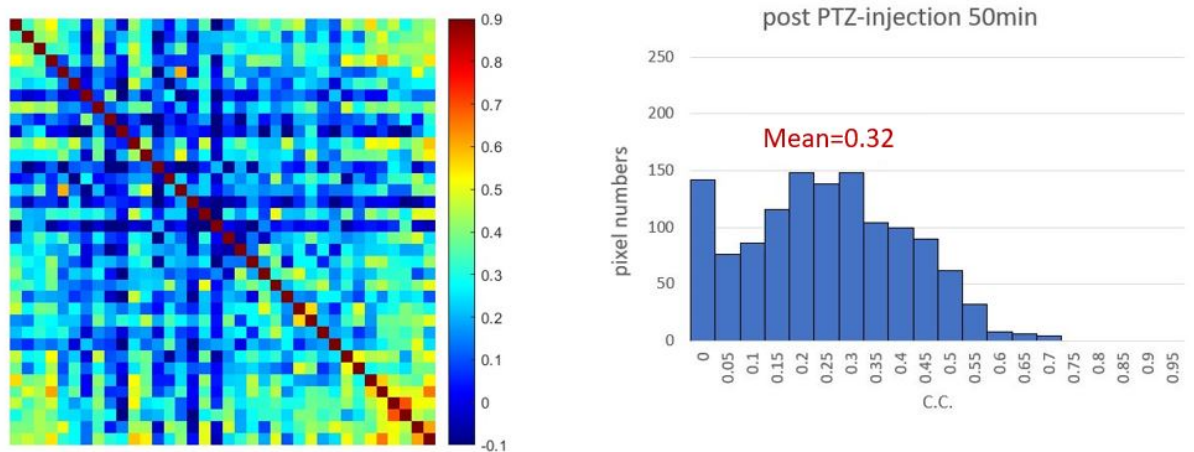


圖 3.14 fMRI 實驗 PTZ(+)/FUS(-) 組動物實驗結果，PTZ 注射後 50 分鐘 FC 矩陣與 C.C. 分布 Histogram，C.C. 平均值為 0.32

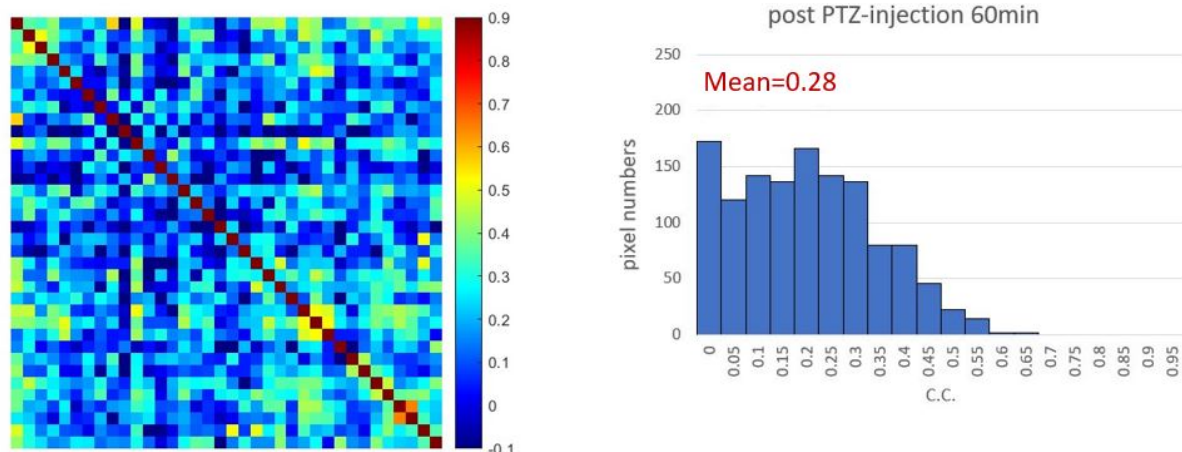


圖 3.15 fMRI 實驗 PTZ(+)/FUS(-) 組動物實驗結果，PTZ 注射後 60 分鐘 FC 矩陣與 C.C. 分布 Histogram，C.C. 平均值為 0.28

分別對 6 隻 EEG 實驗 PTZ(+)/FUS(-) 組動物的 spike，與 6 隻 fMRI 實驗 PTZ(+)/FUS(-) 組動物的海馬迴對視丘 C.C. 做平均值計算，圖 3.16 為 EEG spike 與 C.C 隨時間變化之趨勢直方圖，可見在時間點 0min 注射 PTZ 之後，EEG spike 數量的上升 (由 17.5 上升至 111.8)，對比腦區與腦區之間功能性連結變化呈現類似的趨勢 (C.C. 由上升 0.24 至 0.58)，皆在注射後 10 分鐘有顯著提升，之後隨著時間慢慢降低。由於動物在注射 PTZ 後 60 分鐘內，平均 EEG spike 數量明顯高於 baseline，我們判定動物腦內在 60 分鐘內皆處於全腦興奮的狀態，對比海馬迴-視丘功能性連結 C.C. 變化，我們推測 C.C. 高於 0.36 時 (圖 3.16 中 PTZ 注射後 60 分鐘內最低的平均 C.C. 數值)，代表腦內呈現癲癇狀態，但僅限於本研究實驗結果。

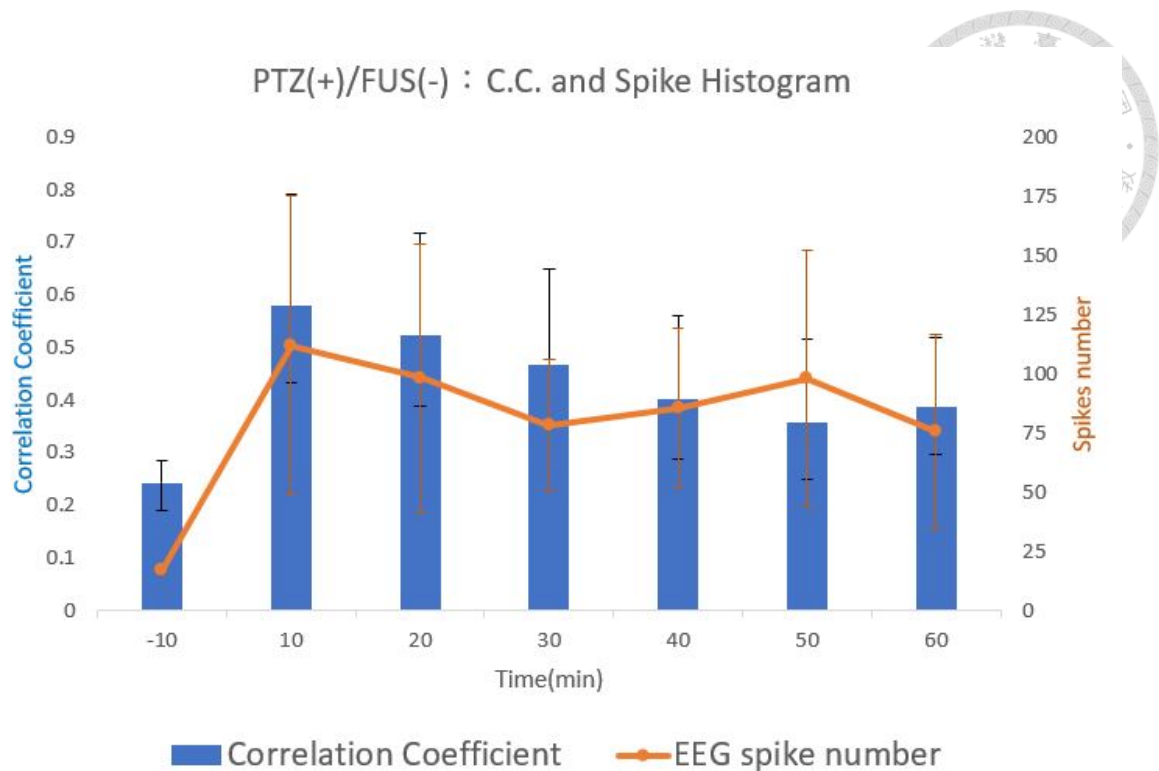


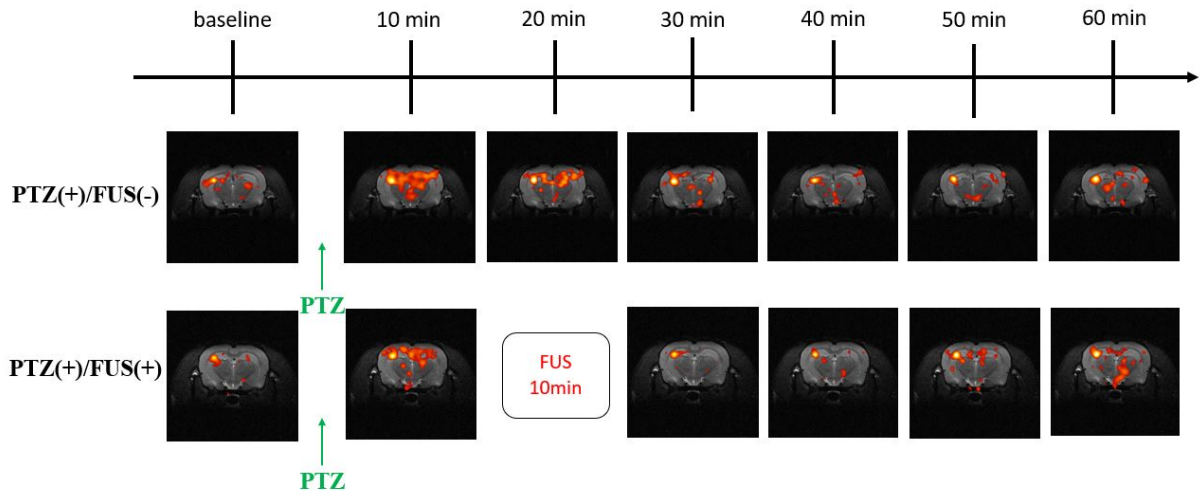
圖 3.16 本研究中 PTZ(+)/FUS(-) 組 EEG spike 與 C.C. 隨時間變化之比較。在時間點 0min 注射 PTZ 之後，EEG spike 數量的上升 (由 17.5 上升至 111.8)，對比腦區與腦區之間功能性連結變化呈現類似的趨勢 (C.C. 由上升 0.24 至 0.58)，皆在注射後 10 分鐘有顯著提升，之後隨著時間慢慢降低

3.4 超音波治療後藥物誘發癲癇動物 fMRI 結果

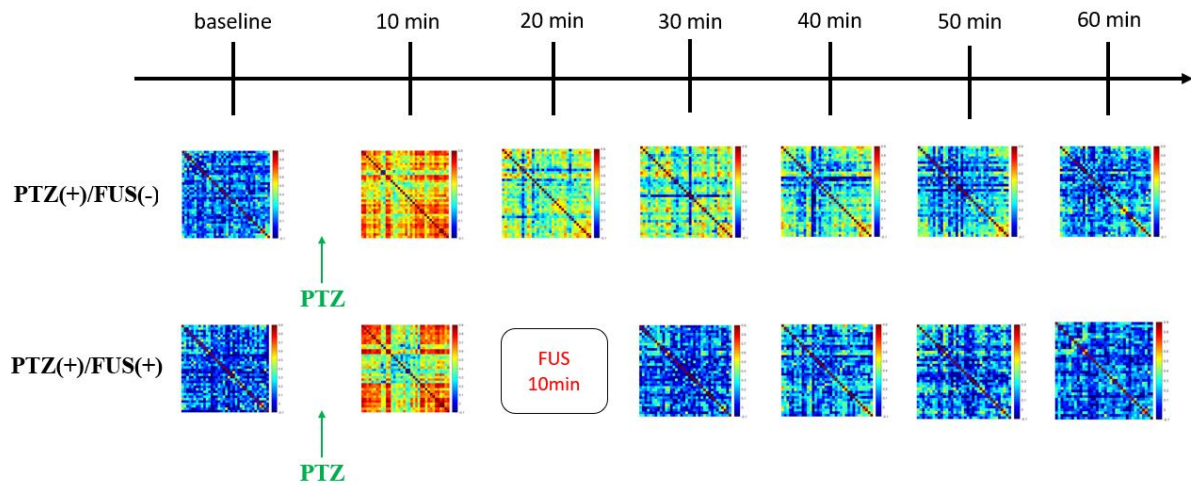
參考 EEG 組實驗，為了在同一實驗觀察 PTZ 誘發癲癇與 FUS 抑制癲癇的成果，在 PTZ 注射後先進行一組 fMRI 掃描 (10 分鐘)，再進行 FUS 10 分鐘施打，完成 FUS 之後再進行 4 組的 fMRI 掃描 (共 40 分鐘)。實驗檔案經過 SPM 前處理與 RESTplus 後處理後，BOLD map 結果如圖 3.17(a)，seed 位置在左側海馬迴，可觀察到對比 PTZ(+)/FUS(-) 組的影像，PTZ(+)/FUS(+) 組在注射 PTZ 後的前 10 分鐘，在皮質、右側海馬迴與部分視丘的腦區，功能性連結較明顯的區域面積有顯著上升，但在 FUS 介入後，前 20 分鐘 (圖中第 30、40min) 功能性連結較明顯的區域面積明顯下降，到 FUS 後 30、40 分鐘 (圖中第 50、60min)，在視丘與部分海馬迴腦區的區域面積才有些許上升；功能性連結矩陣的結果如圖 3.17(b)，可觀察到對比 PTZ(+)/FUS(-) 組的矩陣，PTZ(+)/FUS(+) 組在注射 PTZ 後的前 10 分鐘，

大部分腦區的功能性連結數值皆有上升，顏色由藍色轉變為黃綠色與棕紅色，但在 FUS 介入後，各腦區的功能性連結皆下降，大部分腦區與腦區間的顏色呈現接近 baseline。PTZ(+)/FUS(+) 組的 6 隻動物 FC 矩陣結果如圖 3.18，在注射 PTZ 後 10 分鐘內，矩陣顏色由青藍色變成棕紅色，代表腦區與腦區間的功能性連結，數值皆有上升趨勢，在 FUS 介入後，矩陣顏色轉為青藍色，代表各腦區的功能性連結皆下降至接近 baseline。

藉由功能性連結矩陣中的 C.C. 的分布 Histogram，可看見 PTZ 注射後與 FUS 施打後的數量分布改變，取 PTZ(+)/FUS(+) 組的 Rat11 為例，如圖 3.19。baseline 的 C.C. 分布主要在 -0.1 至 0.55，平均值為 0.17，如圖 3.20；施打 PTZ 後 10 分鐘分布在 0.1-0.95，平均值為 0.63，如圖 3.21；施打 FUS 後 10 分鐘分布在 0.0-0.55，平均值為 0.23，如圖 3.22；施打 FUS 後 20 分鐘分布在 -0.1-0.65，平均值為 0.31，如圖 3.23；施打 FUS 後 30 分鐘分布在 -0.1-0.55，平均值為 0.26，如圖 3.24；施打 FUS 後 40 分鐘分布在 -0.1-0.55，平均值為 0.29，如圖 3.25。



(a) PTZ(+)/FUS(-) 組與 PTZ(+)/FUS(+) 組動物 BOLD map，seed 位置在左側海馬迴



(b) PTZ(+)/FUS(-) 組與 PTZ(+)/FUS(+) 組動物 FC 矩陣

圖 3.17 fMRI 實驗 PTZ(+)/FUS(-) 組與 PTZ(+)/FUS(+) 組動物實驗結果。(a) 在注射 PTZ 後的前 10 分鐘，在皮質、右側海馬迴與部分視丘的腦區，訊號強度皆有顯著上升，在 FUS 介入後，各腦區訊號強度明顯下降。(b) 在注射 PTZ 後的前 10 分鐘，顏色由藍色轉變為黃綠色與棕紅色，代表腦區與腦區間的功能性連結數值有上升趨勢，在 FUS 介入後，各腦區的功能性連結下降至接近 baseline

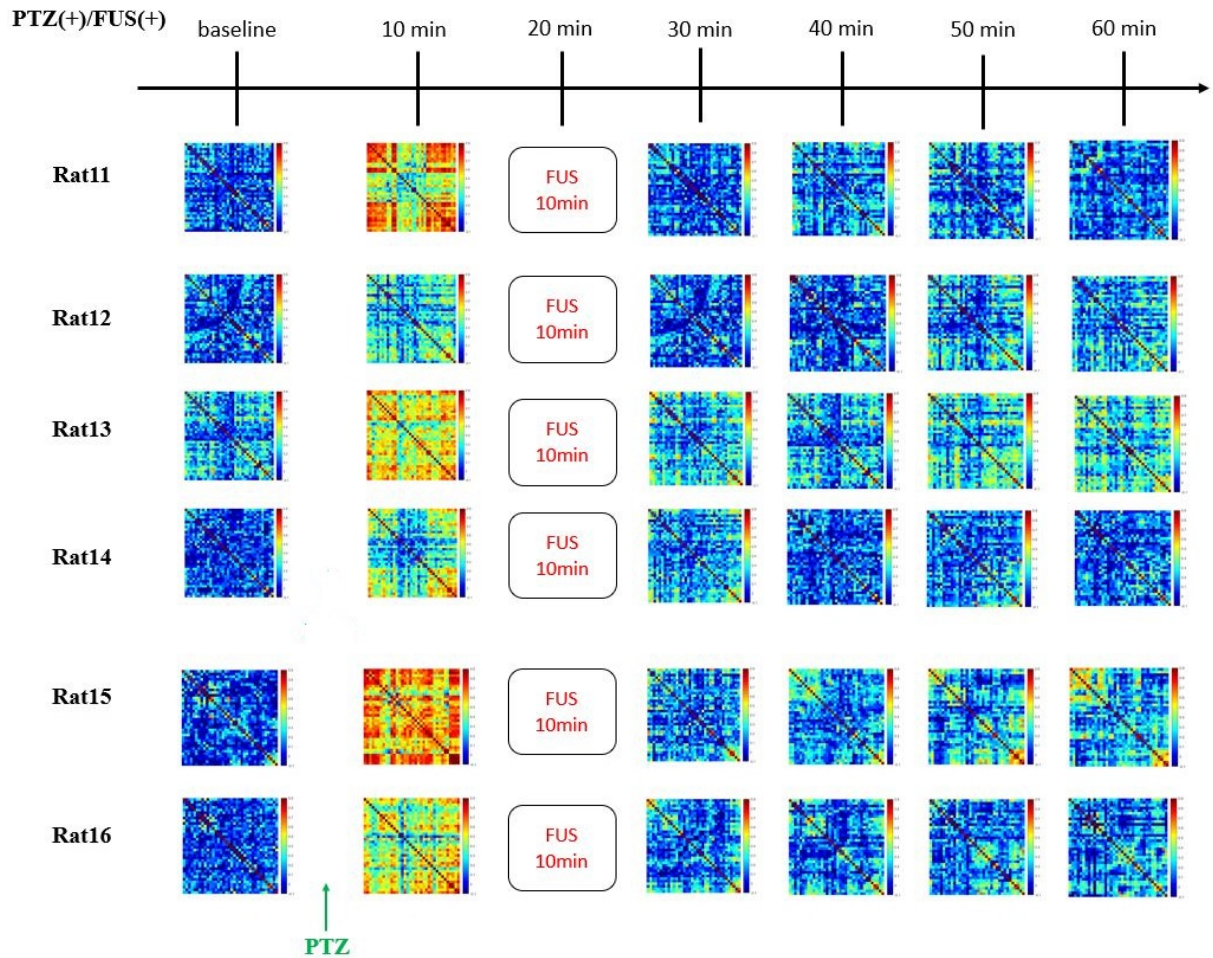


圖 3.18 fMRI 實驗 PTZ(+)/FUS(+) 組 6 隻動物的 FC 矩陣。在注射 PTZ 後 10 分鐘內，矩陣顏色由青藍色變成棕紅色，代表腦區與腦區間的功能性連結，數值皆有上升趨勢，在 FUS 介入後，矩陣顏色轉為青藍色，代表各腦區的功能性連結皆下降至接近 baseline

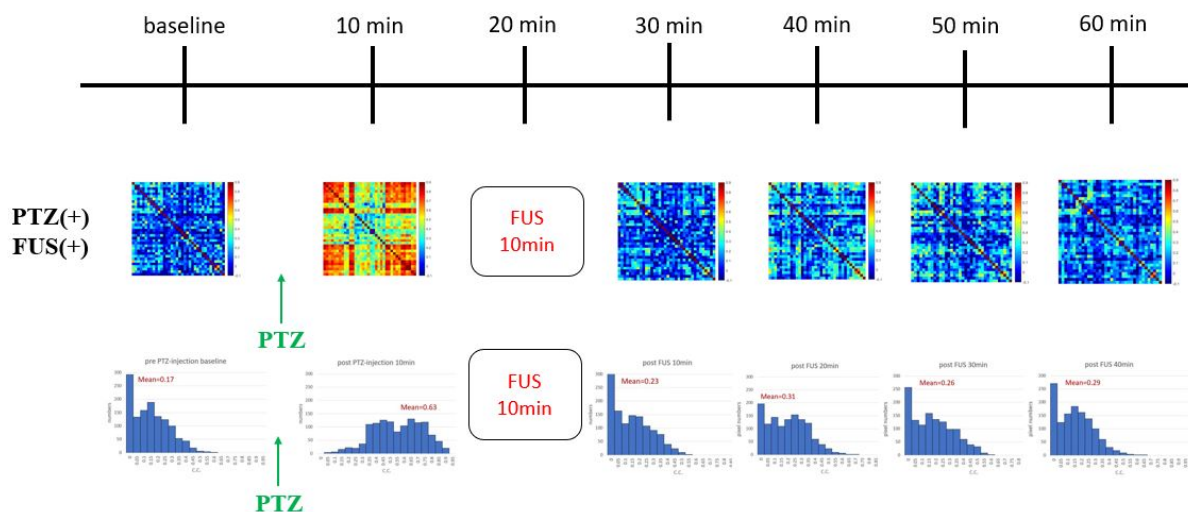


圖 3.19 fMRI 實驗 PTZ(+)/FUS(+) 組動物 fMRI 結果 C.C. 分布 Histogram。對比藥物注射前的 C.C. 平均值 0.17，注射後 10 分鐘平均值上升至 0.63，FUS 介入後平均值下降至 0.23，40 分鐘內平均值最高為 0.31

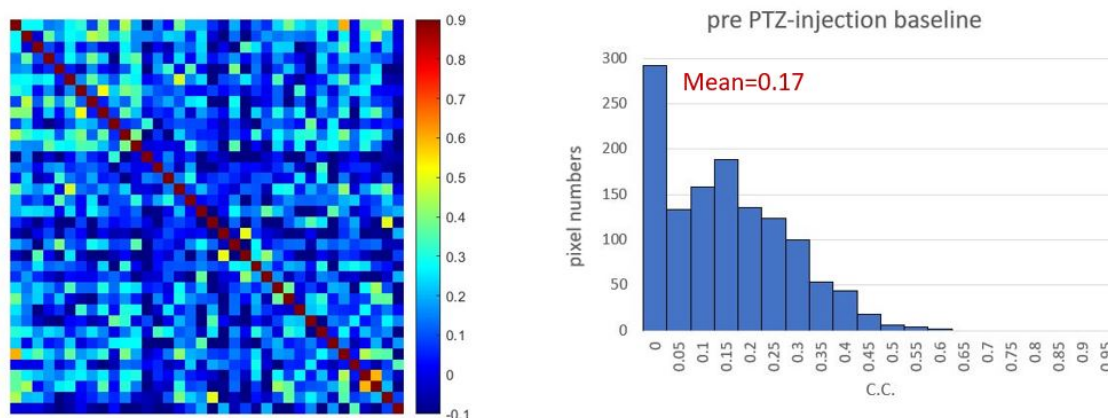


圖 3.20 fMRI 實驗 PTZ(+)/FUS(+) 組動物實驗結果，PTZ 注射前 FC 矩陣與 C.C. 分布 Histogram，平均值為 0.17

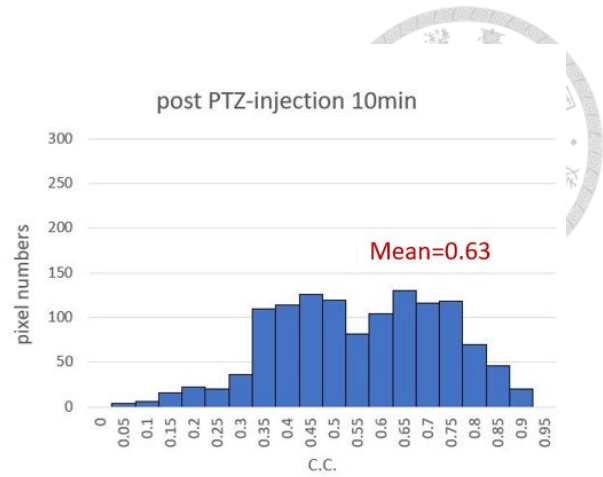
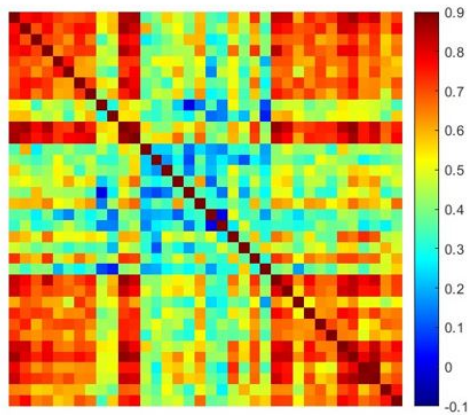


圖 3.21 fMRI 實驗 PTZ(+)/FUS(+) 組動物實驗結果，PTZ 注射後 10 分鐘 FC 矩陣與 C.C. 分布 Histogram，平均值為 0.63

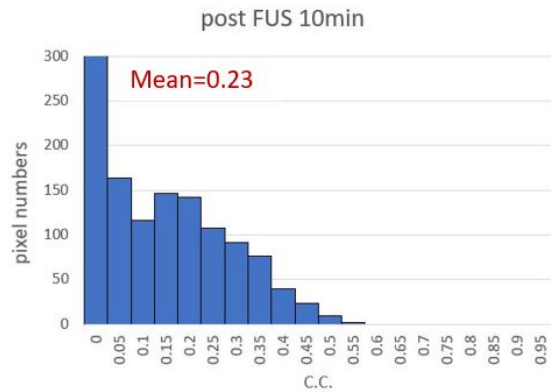
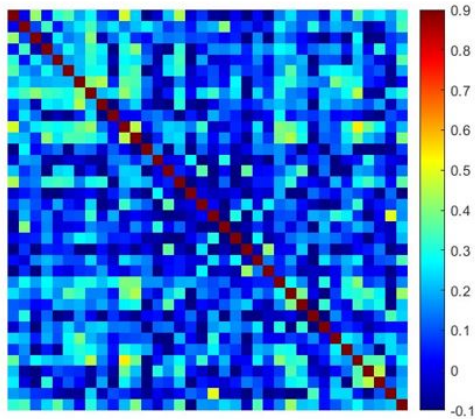


圖 3.22 fMRI 實驗 PTZ(+)/FUS(+) 組動物實驗結果，FUS 施打後 10 分鐘 FC 矩陣與 C.C. 分布 Histogram，平均值為 0.23

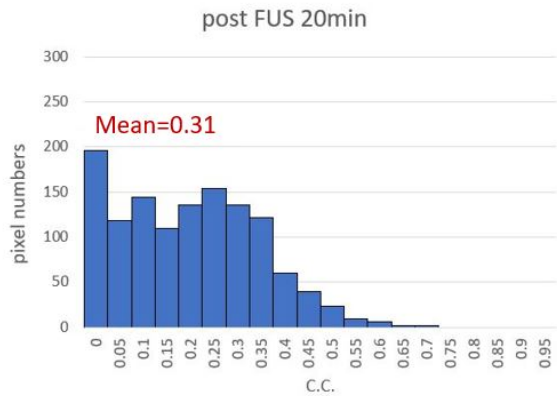
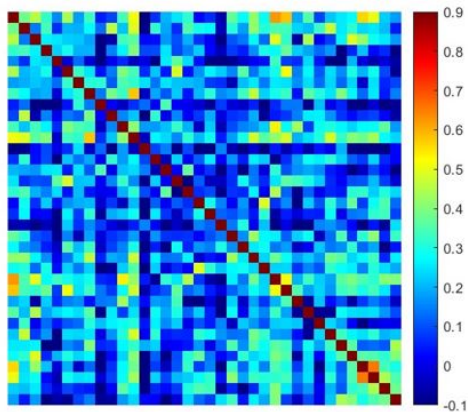


圖 3.23 fMRI 實驗 PTZ(+)/FUS(+) 組動物實驗結果，FUS 施打後 20 分鐘 FC 矩陣與 C.C. 分布 Histogram，平均值為 0.31

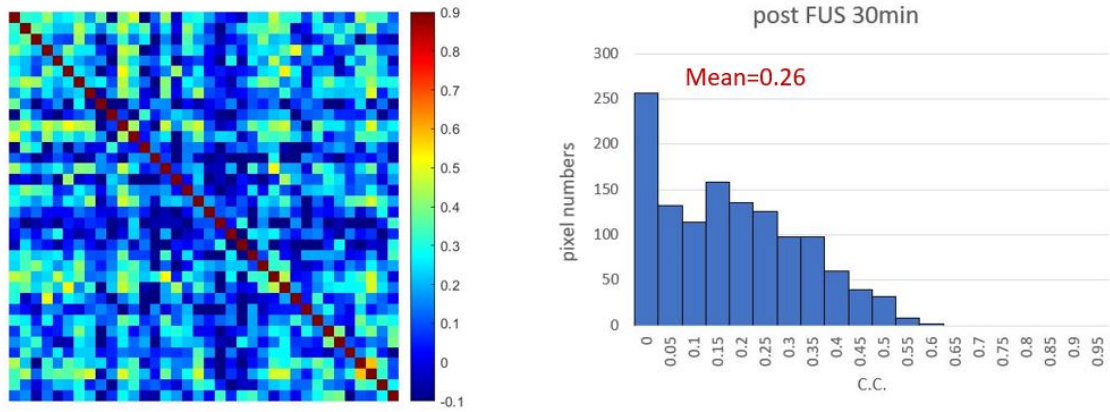


圖 3.24 fMRI 實驗 PTZ(+)/FUS(+) 組動物實驗結果，FUS 施打後 30 分鐘 FC 矩陣與 C.C. 分布 Histogram，平均值為 0.26

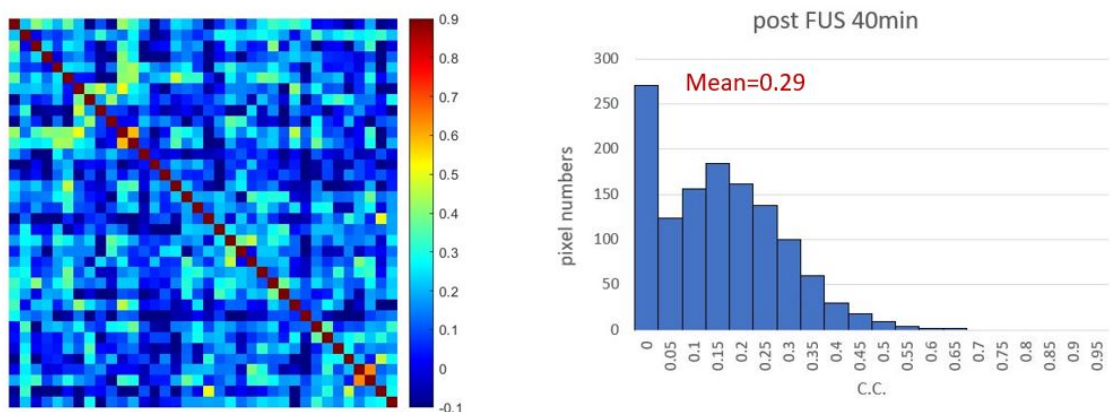


圖 3.25 fMRI 實驗 PTZ(+)/FUS(+) 組動物實驗結果，FUS 施打後 40 分鐘 FC 矩陣與 C.C. 分布 Histogram，平均值為 0.29

分別對 8 隻 EEG 實驗 PTZ(+)/FUS(+) 組動物的 spike，與 6 隻 fMRI 實驗 PTZ(+)/FUS(+) 組動物的海馬迴對視丘 C.C. 做平均值計算，圖 3.26 為 EEG spike 與 C.C. 時間變化之趨勢直方圖。跟可見在時間點 0min 注射 PTZ 之後，EEG spike 數量的上升 (由 17.2 上升至 109.8)，對比腦區與腦區之間功能性連結變化呈現類似的趨勢 (C.C. 由上升 0.23 至 0.57)，皆在注射後 10 分鐘有顯著提升；在 FUS 介入治療後，EEG spike 數量下降 (由 109.8 下降至 47.4)，C.C 平均數值也下降 (由 0.57 下降至 0.25)，呈現癲癇被抑制的結果，對比海馬迴-視丘功能性連結 C.C. 變化，我們推測施打 FUS 後 C.C. 低於 0.31 時 (圖 3.26 中 FUS 施打後 40min 內最高的平均 C.C. 數值)，代表腦內癲癇狀態已被一定程度抑制，但僅限於本研究實驗結果。

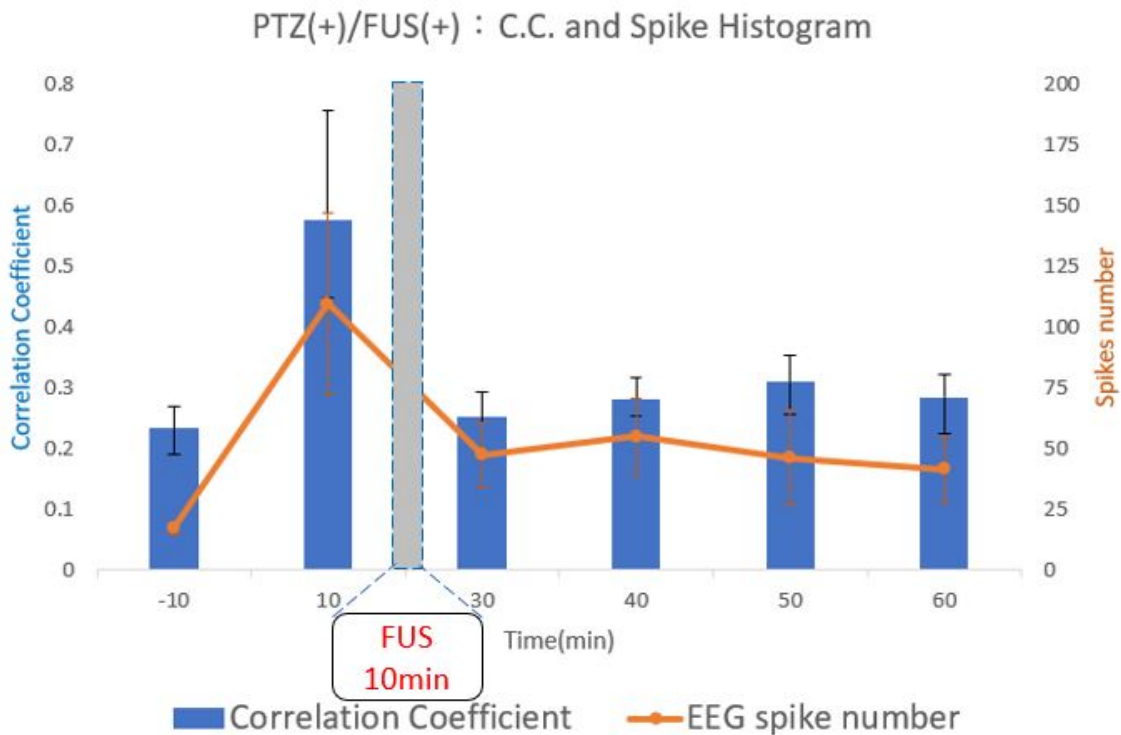


圖 3.26 本研究中 PTZ(+)/FUS(+) 組 EEG spike 與 C.C. 隨時間變化之比較。在時間點 0min 注射 PTZ 之後，EEG spike 數量的上升 (由 17.2 上升至 109.8)，對比腦區與腦區之間功能性連結變化呈現類似的趨勢 (C.C. 由上升 0.23 至 0.57)，皆在注射後 10 分鐘有顯著提升；在 FUS 介入治療後，EEG spike 數量下降 (由 109.8 下降至 47.4)，C.C 平均數值也下降 (由 0.57 下降至 0.25)，呈現癲癇被抑制的結果



3.5 統計分析結果

3.5.1 EEG 組分析結果

以下為 EEG 實驗 PTZ(+)/FUS(+) 組的 8 隻動物，分別在只注射 PTZ 與注射 PTZ 後施打 FUS 情形下的數據，每兩分鐘累計一次 spike 數量並以點位標註，只注射 PTZ 的 spike 用黑點表示，注射 PTZ 後施打 FUS 的 spike 用紅線表示，如圖 3.27。

針對 EEG 組進行 two-tailed/paired Student's T-test 分析，把 Normal 組、PTZ(+)/FUS(-) 組、PTZ(+)/FUS(+) 組的 spike 數量做比較。P value 分別為 Normal 組比較 PTZ(+)/FUS(-) 組的顯著性差異，以綠色星號標示；PTZ(+)/FUS(-) 組比較 PTZ(+)/FUS(+) 組的顯著性差異，以紅色井號標示，結果如圖 3.28。可看到相較於 Normal 組，在 PTZ 注射 10 分鐘後，PTZ(+)/FUS(-) 組的 spike 數量為 111.8 ± 63.1 ($p=0.019$)、PTZ(+)/FUS(+) 組的 spike 數量則為 109.4 ± 37.5 ；注射 20 分鐘後，PTZ(+)/FUS(-) 組的 spike 數量為 98.25 ± 56.5 ($p=0.025$)、PTZ(+)/FUS(+) 組正在施打 FUS，故無法記錄 EEG；注射 30 分鐘後，PTZ(+)/FUS(-) 組的 spike 數量為 78.2 ± 27.5 ($p=0.003$)、PTZ(+)/FUS(+) 組的 spike 數量則為 47.4 ± 13.4 ($p=0.014$)，spike 數量下降 39.2%；注射 40 分鐘後，PTZ(+)/FUS(-) 組的 spike 數量為 85.6 ± 33.7 ($p=0.006$)、PTZ(+)/FUS(+) 組的 spike 數量則為 54.9 ± 15.8 ($p=0.111$)，spike 數量下降 35.8%；注射 50 分鐘後，PTZ(+)/FUS(-) 組的 spike 數量為 97.9 ± 54.5 ($p=0.022$)、PTZ(+)/FUS(+) 組的 spike 數量則為 46.1 ± 19.5 ($p=0.128$)，spike 數量下降 52.9%；注射 60 分鐘後，PTZ(+)/FUS(-) 組的 spike 數量為 75.8 ± 40.5 ($p=0.021$)、PTZ(+)/FUS(+) 組的 spike 數量則為 41.3 ± 13.5 ($p=0.135$)，spike 數量下降 45.5%，相關數據整理在表 3.1。

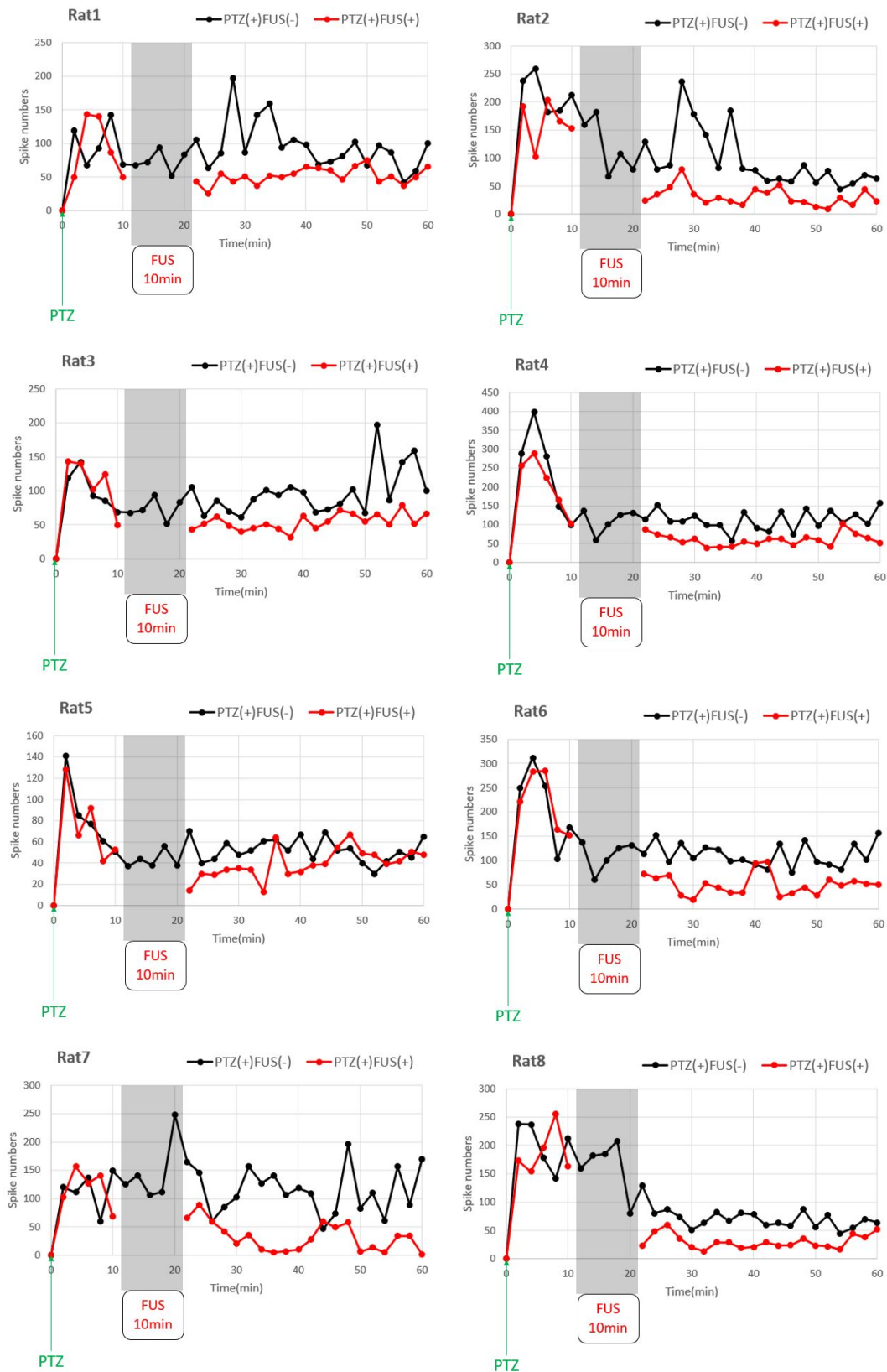


圖 3.27 EEG 實驗 PTZ(+)/FUS(+) 組的 8 隻動物，分別在只注射 PTZ(黑線) 與注射 PTZ 後施打 FUS(紅線) 情形的 spike 數量，每 2 分鐘做一次累計

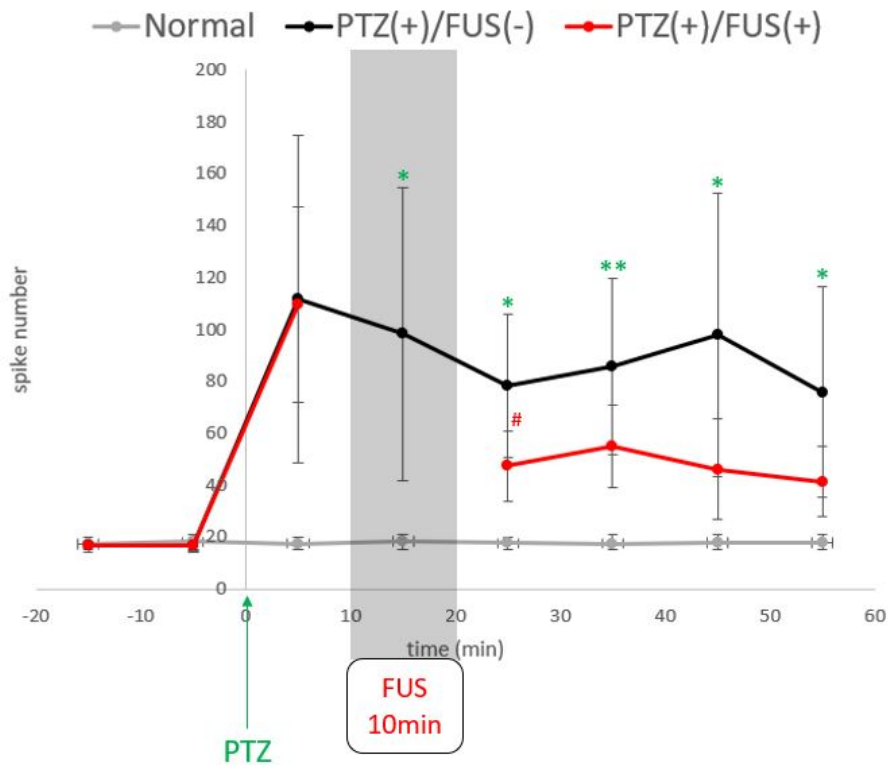


圖 3.28 EEG 實驗 T-test 統計分析結果，對比 Normal 組 (灰線)，注射 PTZ 後的 spike 數量明顯上升 (由 17.5 上升至 111.8)；比較 PTZ(+)/FUS(-) 組 (黑線) 與 PTZ(+)/FUS(+) 組 (紅線)，在 FUS 介入後 spike 數量減少 35.8% - 52.9%。* 代表 Normal 組與 PTZ(+)/FUS(-) 組的顯著性差異，* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ ；# 代表 PTZ(+)/FUS(-) 組與 PTZ(+)/FUS(+) 組的顯著性差異，# $P < 0.05$, ## $P < 0.01$

表 3.1 EEG 實驗 T-test 統計分析 spike 數量與 p value

EEG group	baseline	10 min	20 min	30 min	40 min	50 min	60 min
Normal	18.3	17.5	18.4	17.6	17.5	17.8	17.7
PTZ(+)/FUS(-)	17.0	111.8	98.3	78.2	85.6	97.9	75.8
PTZ(+)/FUS(+)	17.1	109.4	-	47.4	54.9	46.1	41.3
p (Normal vs PTZ)	-	0.019	0.025	0.003	0.068	0.022	0.021
p (non-FUS vs FUS)	-	-	-	0.014	0.112	0.128	0.135



3.5.2 fMRI 組分析結果

針對 fMRI 組進行 two-tailed/paired Student's T-test 分析，把 Normal 組、PTZ(+)/FUS(-) 組、PTZ(+)/FUS(+) 組的巴貝茲迴路相關腦區，海馬迴與視丘的功能性連結做比。P value 分別為 Normal 組比較 PTZ(+)/FUS(-) 組的顯著性差異，以綠色星號標示；PTZ(+)/FUS(-) 組比較 PTZ(+)/FUS(+) 組的顯著性差異，以紅色井號標示，結果如圖 3.29，Normal 組以藍色柱狀圖表示、PTZ(+)/FUS(-) 組以綠色柱狀圖表示、PTZ(+)/FUS(+) 組以紅色柱狀圖表示。可看到相較於 Normal 組，在 PTZ 注射 10 分鐘後，PTZ(+)/FUS(-) 組的 C.C. 為 0.58 ± 0.173 ($p=0.006$)、PTZ(+)/FUS(+) 組的 C.C. 則為 0.57 ± 0.156 ；注射 20 分鐘後，PTZ(+)/FUS(-) 組的 C.C. 為 0.52 ± 0.168 ($p=0.005$)、PTZ(+)/FUS(+) 組正在施打 FUS，故無法進行 fMRI 掃描；注射 30 分鐘後，PTZ(+)/FUS(-) 組的 C.C. 為 0.46 ± 0.159 ($p=0.027$)、PTZ(+)/FUS(+) 組的 C.C. 則為 0.25 ± 0.045 ($p=0.013$)，C.C. 下降 45.1%；注射 40 分鐘後，PTZ(+)/FUS(-) 組的 C.C. 為 0.40 ± 0.135 ($p=0.497$)、PTZ(+)/FUS(+) 組的 C.C. 則為 0.28 ± 0.003 ($p=0.039$)，C.C. 下降 30.6%；注射 50 分鐘後，PTZ(+)/FUS(-) 組的 C.C. 為 0.35 ± 0.134 ($p=0.305$)、PTZ(+)/FUS(+) 組的 C.C. 則為 0.31 ± 0.006 ($p=0.373$)，C.C. 下降 11.4%；注射 60 分鐘後，PTZ(+)/FUS(-) 組的 C.C. 為 0.38 ± 0.009 ($p=0.116$)、PTZ(+)/FUS(+) 組的 C.C. 則為 0.28 ± 0.007 ($p=0.032$)，C.C. 下降 26.4%，相關數據整理在表 3.2。

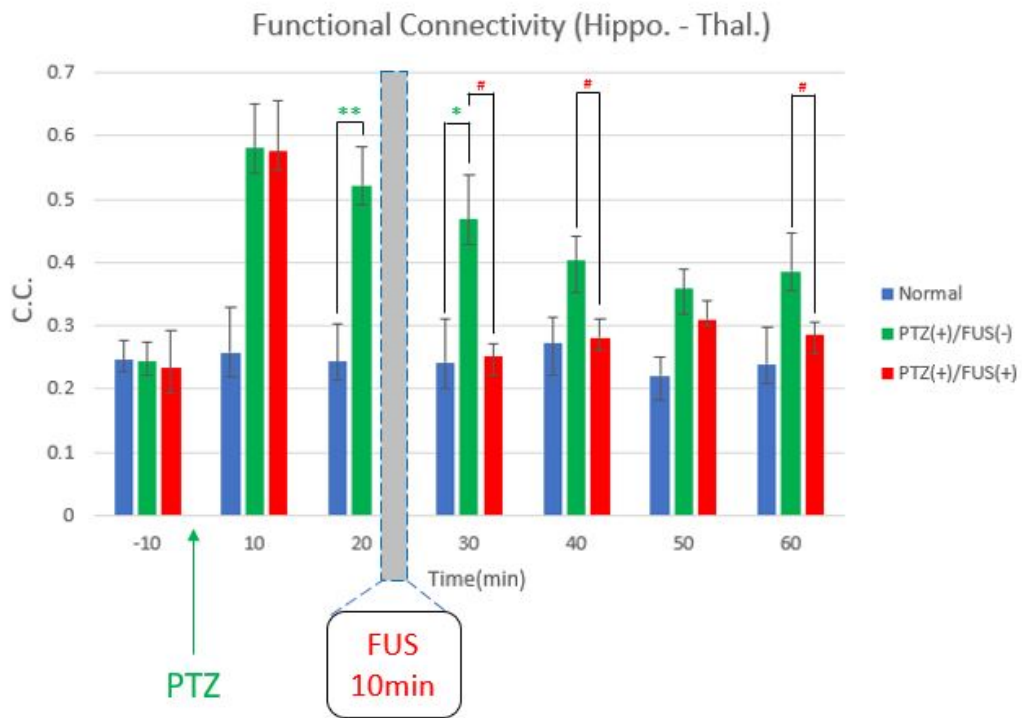



圖 3.29 fMRI 實驗 T-test：海馬迴與視丘的功能性連結 C.C. 結果，對比 Normal 組（藍色柱），注射 PTZ 後的 C.C. 明顯上升（由 0.258 上升至 0.580）；比較 PTZ(+)/FUS(-) 組（綠色柱）與 PTZ(+)/FUS(+) 組（紅色柱），在 FUS 介入後 C.C. 減少 11.4% - 45.1%。* 代表 Normal 組與 PTZ(+)/FUS(-) 組的顯著性差異，* P<0.05, ** P<0.01；# 代表 PTZ(+)/FUS(-) 組與 PTZ(+)/FUS(+) 組的顯著性差異，# P<0.05, ## P<0.01

表 3.2 fMRI 實驗 T-test 統計分析：海馬迴與視丘的 C.C. 與 p value

fMRI group	baseline	10 min	20 min	30 min	40 min	50 min	60 min
Normal	0.246	0.258	0.243	0.241	0.272	0.221	0.238
PTZ(+)/FUS(-)	0.243	0.580	0.521	0.468	0.402	0.358	0.386
PTZ(+)/FUS(+)	0.233	0.574	-	0.251	0.281	0.309	0.284
p (Normal vs PTZ)	-	-	0.005	0.027	0.496	0.305	0.116
p (non-FUS vs FUS)	-	-	-	0.013	0.039	0.373	0.032



本研究也想觀察其他巴貝茲迴路相關腦區與腦區間功能性連結是否受到 FUS 影響。選擇海馬迴與視丘腹後內/外側核的功能性連結做比較，結果如圖 3.30，Normal 組以藍色柱狀圖表示、PTZ(+)/FUS(-) 組以綠色柱狀圖表示、PTZ(+)/FUS(+) 組以紅色柱狀圖表示，P value 分別為 Normal 組比較 PTZ(+)/FUS(-) 組的顯著性差異，以綠色星號標示；PTZ(+)/FUS(-) 組比較 PTZ(+)/FUS(+) 組的顯著性差異，以紅色井號標示。可看到相較於 Normal 組，在 PTZ 注射 10 分鐘後，PTZ(+)/FUS(-) 組的 C.C. 為 0.53 ± 0.173 ($p=0.003$)、PTZ(+)/FUS(+) 組的 C.C. 則為 0.51 ± 0.121 ；注射 20 分鐘後，PTZ(+)/FUS(-) 組的 C.C. 為 0.48 ± 0.176 ($p=0.004$)、PTZ(+)/FUS(+) 組正在施打 FUS，故無法進行 fMRI 掃描；注射 30 分鐘後，PTZ(+)/FUS(-) 組的 C.C. 為 0.44 ± 0.154 ($p=0.016$)、PTZ(+)/FUS(+) 組的 C.C. 則為 0.21 ± 0.005 ($p=0.009$)，C.C. 下降 52.3%；注射 40 分鐘後，PTZ(+)/FUS(-) 組的 C.C. 為 0.38 ± 0.145 ($p=0.045$)、PTZ(+)/FUS(+) 組的 C.C. 則為 0.24 ± 0.042 ($p=0.067$)，C.C. 下降 36.9%；注射 50 分鐘後，PTZ(+)/FUS(-) 組的 C.C. 為 0.33 ± 0.126 ($p=0.089$)、PTZ(+)/FUS(+) 組的 C.C. 則為 0.28 ± 0.035 ($p=0.315$)，C.C. 下降 15.2%；注射 60 分鐘後，PTZ(+)/FUS(-) 組的 C.C. 為 0.37 ± 0.078 ($p=0.032$)、PTZ(+)/FUS(+) 組的 C.C. 則為 0.29 ± 0.031 ($p=0.098$)，C.C. 下降 21.7%，相關數據整理在表 3.3。

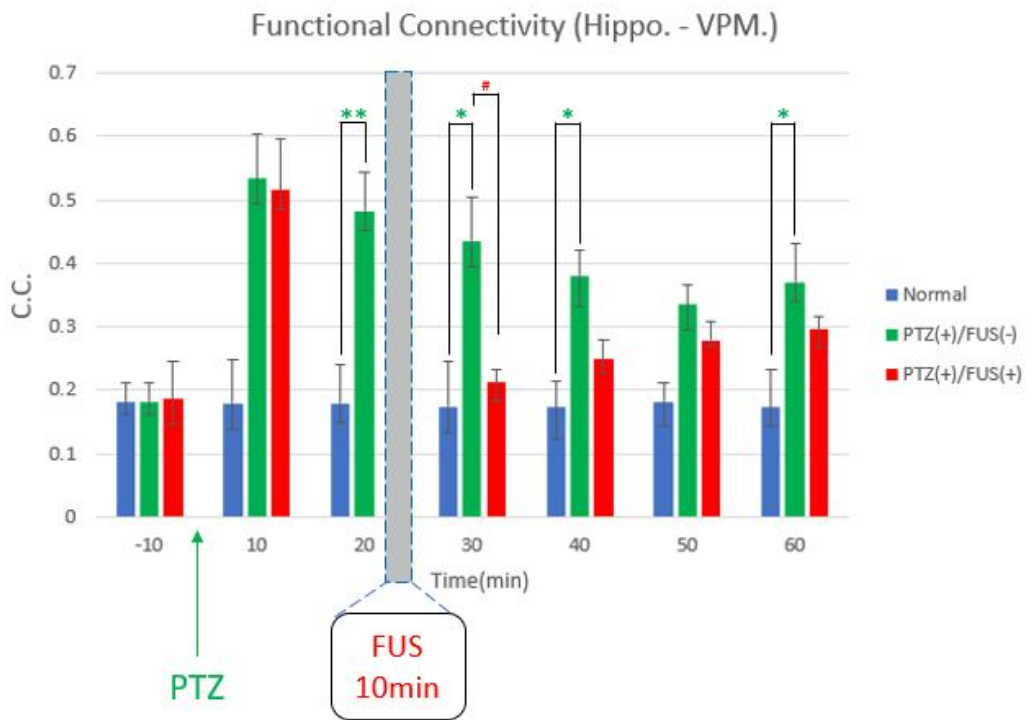
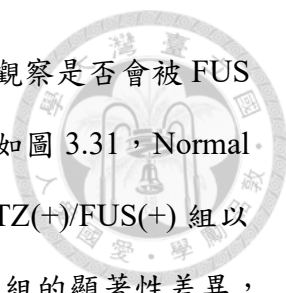


圖 3.30 fMRI 實驗 T-test：海馬迴與視丘腹後內/外側核的功能性連結 C.C. 結果，對比 Normal 組 (藍色柱)，注射 PTZ 後的 C.C. 明顯上升 (由 0.179 上升至 0.533)；比較 PTZ(+)/FUS(-) 組 (綠色柱) 與 PTZ(+)/FUS(+) 組 (紅色柱)，在 FUS 介入後 C.C. 減少 15.2% - 52.3%。* 代表 Normal 組與 PTZ(+)/FUS(-) 組的顯著性差異，* P<0.05，** P<0.01；# 代表 PTZ(+)/FUS(-) 組與 PTZ(+)/FUS(+) 組的顯著性差異，# P<0.05，## P<0.01

表 3.3 fMRI 實驗 T-test 統計分析：海馬迴與視丘腹後內/外側核的 C.C. 與 p value

fMRI group	baseline	10 min	20 min	30 min	40 min	50 min	60 min
Normal	0.180	0.179	0.179	0.174	0.172	0.182	0.173
PTZ(+)/FUS(-)	0.182	0.533	0.482	0.435	0.381	0.334	0.370
PTZ(+)/FUS(+)	0.185	0.515	-	0.212	0.248	0.278	0.295
p (Normal vs PTZ)	-	-	0.005	0.016	0.045	0.089	0.032
p (non-FUS vs FUS)	-	-	-	0.009	0.067	0.315	0.098



最後是比較同為巴貝茲迴路的視丘與視丘腹後內/外側核，觀察是否會被 FUS 所影響。視丘與視丘腹後內/外側核的功能性連結做比較，結果如圖 3.31，Normal 組以藍色柱狀圖表示、PTZ(+)/FUS(-) 組以綠色柱狀圖表示、PTZ(+)/FUS(+) 組以紅色柱狀圖表示，P value 分別為 Normal 組比較 PTZ(+)/FUS(-) 組的顯著性差異，以綠色星號標示；PTZ(+)/FUS(-) 組比較 PTZ(+)/FUS(+) 組的顯著性差異，以紅色井號標示。可看到相較於 Normal 組，在 PTZ 注射 10 分鐘後，PTZ(+)/FUS(-) 組的 C.C. 為 0.61 ± 0.126 ($p=0.002$)、PTZ(+)/FUS(+) 組的 C.C. 則為 0.61 ± 0.118 ；注射 20 分鐘後，PTZ(+)/FUS(-) 組的 C.C. 為 0.51 ± 0.075 ($p=0.001$)、PTZ(+)/FUS(+) 組正在施打 FUS，故無法進行 fMRI 掃描；注射 30 分鐘後，PTZ(+)/FUS(-) 組的 C.C. 為 0.47 ± 0.163 ($p=0.002$)、PTZ(+)/FUS(+) 組的 C.C. 則為 0.18 ± 0.006 ($p=0.001$)，C.C. 下降 61.8%；注射 40 分鐘後，PTZ(+)/FUS(-) 組的 C.C. 為 0.36 ± 0.106 ($p=0.020$)、PTZ(+)/FUS(+) 組的 C.C. 則為 0.21 ± 0.052 ($p=0.002$)，C.C. 下降 41.7%；注射 50 分鐘後，PTZ(+)/FUS(-) 組的 C.C. 為 0.41 ± 0.071 ($p=0.011$)、PTZ(+)/FUS(+) 組的 C.C. 則為 0.26 ± 0.068 ($p=0.004$)，C.C. 下降 36.6%；注射 60 分鐘後，PTZ(+)/FUS(-) 組的 C.C. 為 0.40 ± 0.076 ($p=0.006$)、PTZ(+)/FUS(+) 組的 C.C. 則為 0.25 ± 0.043 ($p=0.003$)，C.C. 下降 37.5%，相關數據整理在表 3.4。

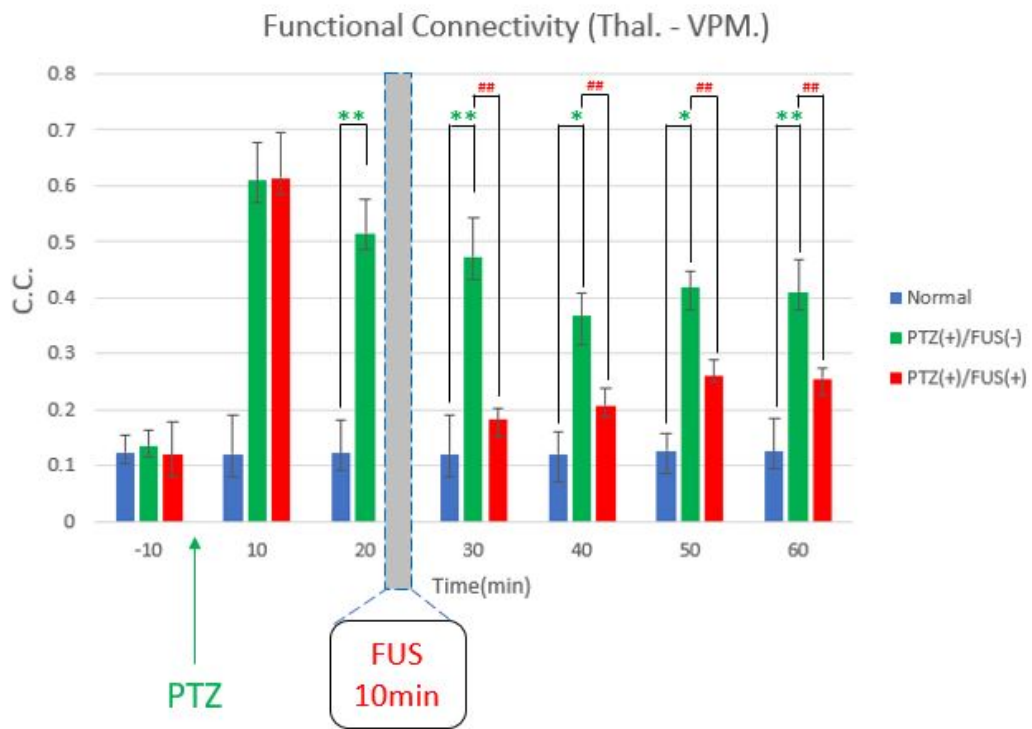


圖 3.31 fMRI 實驗 T-test：視丘與視丘腹後內/外側核的功能性連結 C.C. 結果，對比 Normal 組 (藍色柱)，注射 PTZ 後的 C.C. 明顯上升 (由 0.121 上升至 0.609)；比較 PTZ(+)/FUS(-) 組 (綠色柱) 與 PTZ(+)/FUS(+) 組 (紅色柱)，在 FUS 介入後 C.C. 減少 36.6% - 61.8%。* 代表 Normal 組與 PTZ(+)/FUS(-) 組的顯著性差異，* P<0.05, ** P<0.01；# 代表 PTZ(+)/FUS(-) 組與 PTZ(+)/FUS(+) 組的顯著性差異，# P<0.05, ## P<0.01

表 3.4 fMRI 實驗 T-test 統計分析：視丘與視丘腹後內/外側核的 C.C. 與 p value

fMRI group	baseline	10 min	20 min	30 min	40 min	50 min	60 min
Normal	0.124	0.121	0.122	0.121	0.121	0.127	0.126
PTZ(+)/FUS(-)	0.134	0.609	0.515	0.474	0.367	0.418	0.408
PTZ(+)/FUS(+)	0.120	0.614	-	0.183	0.208	0.260	0.255
p (Normal vs PTZ)	-	-	0.002	0.001	0.020	0.011	0.006
p (non-FUS vs FUS)	-	-	-	0.001	0.002	0.004	0.003



第四章 討論

4.1 神經調控抑制癲癇文獻比較

如第一章所提，當病患被診斷出癲癇之後，通常會選擇藥物治療或手術治療，手術治療之前要是無法從醫學影像中看出病灶所在，醫療人員難以進行術前規劃；藥物治療則會根據病患的發作次數、頻率乃至於 EEG 檢查分析結果，去決定要開哪一種或數種抗癲癇藥物。在第一次癲癇發作後開始使用抗癲癇藥物治療，可使未來兩年內的絕對復發風險減少 35% [57]。

若藥物和手術都不適合病患，則會選擇神經調控作為替代療法，常見的神經調控方法包含 DBS、VNS 與 RNS，這些方法在過去的研究中，皆有揭示對癲癇抑制的即期與長期效果，根據 Markert 等人整理的文獻數據，目前在臨床上神經調控至少有 31% 以上的即期抑制效果 [58]。DBS 的即期抑制效果為 40.4%，在 Fisher 等人的研究中，刺激的益處往往隨時間增加，在植入後通常 1-2 年內達到最大效果。典型的癲癇發作頻率減少大約為 40%，經過幾年後可達 50-69%，癲癇的嚴重程度可能也會減輕 [59]；在 Englot 等人的研究中，患者經過 VNS 後平均癲癇發作頻率減少了 45%，手術後 3-12 個月的癲癇發作減少了 36%，一年以上的治療後減少了 51% [60]；Heck 等人的研究顯示，RNS 主動刺激組的癲癇發作頻率百分比減少 37.9%，偽刺激組為 17.3%，主動刺激組和偽刺激組接受者的嚴重不良事件率無明顯差異 [61]；Bergey 等人的 RNS 研究成果，1 年時的癲癇發作百分比減少中位數為 44%，2 年時為 53%，在長期研究的植入後第 3 年至第 6 年期間，癲

癲癇發作減少率在 48% 至 66% 之間，最常見的與設備相關的嚴重不良事件是植入部位感染 (9.0%) 涉及軟組織和神經刺激器植入體拆除 (4.7%) [62]。

表 4.1 神經調控抑制癲癇文獻比較，數據顯示本研究抑制成果與常見神經調控相似

作者, 年分	神經調控方法	發作減少頻率	文獻
Fisher et. al., 2014	DBS	40%	[59]
Englot et. al., 2011	VNS	45%	[60]
Heck et. al., 2014	RNS	37.9%	[61]
This work	FUS	35.9% - 52.9%	-

本研究的動物模型為藥物誘發急性癲癇，希望觀察到超音波神經調控的即時抑制效果，目前研究成果為抑制效果為 35.9% - 52.9%，與目前 DBS、VNS 與 RNS 的臨床成果相似，可見超音波可與目前 FDA 認可的數種神經調控方法達到類似的抑制癲癇效果，且相較於上述的侵入性神經調控，FUS 具有非侵入性與精確性的優勢，在此優勢下還能有相似的癲癇抑制成效，具有成為新替代療法的高度潛力。

4.2 超音波抑制癲癇文獻比較

過去有許多先進們利用癲癇動物模型去探究超音波神經調控抑制癲癇的成效，表 4.2 呈現數篇文獻與本研究的比較，包含癲癇模型誘發藥物、超音波施打參數、實驗動物施打腦區以及 spike 抑制情形。

同為藉由 PTZ 誘發全腦癲癇，Chen 與 Min 與本研究同樣施打丘腦區域，Chen 的研究中測試不同超音波參數 MI 值在抑制癲癇上的成效，MI 0.75、DC 30% 時可達到 88.5% 的 spike 抑制效果，跟本研究比較，或許提高 MI 能增加 FUS 抑制癲癇的效果，但該參數配合 0.5MHz 探頭 I_{spta} 有上升至 2.812W，在 Chu 的文獻中討論提到該 I_{spta} 或有能量過高傷害表層腦皮質組織的疑慮；Min 的超音波施打結果展示能及時抑制癲癇，但 Min 的實驗設置上採用較低的 PTZ 劑量 (45kg/

表 4.2 超音波抑制癲癇文獻，針對不同超音波參數、施打腦區與 spike 抑制情形做比較

作者, 年分	癲癇模型	超音波參數	動物施打腦區	spike 抑制情形	文獻
Chen et. al. 2020	PTZ 100mg/kg	0.5Mhz, MI 0.25-0.75, PRF 100Hz, DC 30%	Rat Thal.	45.6% - 88.5%	[24]
Min et. al. 2011	PTZ 45mg/kg	690KHz, MI 0.33, PRF 100Hz, DC 5%	Rat Thal.	32.4% - 68.2%	[26]
Kim et. al. 2021	PTZ 45mg/kg	1.1MHz, MI 0.28 PRF 100Hz, DC 5%	Rat Cortex	21% - 34%	[33]
Chu et. al. 2022	KA 750ng	0.5Mhz, MI 0.25-0.75, PRF 100hz, DC 30%	Rat Hippo.	18.2% - 31.2%	[25]
Zhang et. al. 2021	KA 6.5mg/kg	0.5MHz, MI 0.093 PRF 1.5kHz, DC 50%	Rat Hippo.	46.7%	[32]
Hakimova et.al. 2015	KA 0.3µg/0.3µl	0.2MHz, MI 0.29 PRF 0.5kHz, DC 50%	Rat Hippo.	84%	[63]
Zou et. al. 2020	Penicillin 2500 IU/uL	800kHz, MI 1.94 PRF 500Hz, DC 36%	Monkey Cortex	41.8%	[64]
Lin et. al. 2020	Penicillin 3000 IU/uL	750kHz, MI 0.40 PRF 1.0kHz, DC 4%	Monkey Cortex	35.1%	[65]
This work	PTZ 70mg/kg	1.0MHz, MI 0.25, PRF 100Hz, DC 30%	Rat Hippo.	35.9% - 52.9%	-

mg)，誘發癲癇不正常放電的持續時間在本研究結果 3.1 小節表明約為 20 分鐘，針對抑制效果持續時間可做出更多實驗與探討，這點也是本研究考量並改善的一點，藉由長時間監測 EEG 與 fMRI，去觀察 FUS 施打後較長時間的神經活動情形。

Kim 在文獻中未表明施打腦區，僅用圖片標示左大腦皮質位置，超音波與 Min 的研究相似，相對低的 MI 與 DC 5%，結果表明 Kim 抑制的效果有限 (最高 34%)，依據癲癇不正常放電病灶位於深層腦區海馬迴，施打皮質僅能抑制部分癲癇發作，對比 Chen 與 Min 的實驗施打視丘，巴貝茲迴路相關腦區，會有更好的抑制效果。

神經元對超聲波的反應率會取決於 PRF [66]，相較於 Chu 的研究，Zhang、Hakimova 採用低 MI、高 PRF 與高 DC 的設置，意即用更多次數的低強度 FUS 去

刺激腦區，結果呈現更好的癲癇抑制成效 (Chu 31.2% 與 Zhang 46.7%)。本研究相較於 Min 的研究也有相同趨勢，本研究超音波施打 protocol 為五次 30 秒鐘 (在 10 分鐘內完成)，Min 的施打則為兩次 3 分鐘，結果呈現更好的抑制趨勢。


綜上所述，未來研究在超音波參數調整部分，維持低強度的 MI 值與足夠的 DC 值，並將施打 protocol 改為短時間多次施打，為抑制癲癇帶來更好效果的實驗方向。

4.3 神經調控刺激視丘文獻比較

目前神經調控抑制癲癇的刺激位置，常見的有海馬迴、視丘 CM 與視丘前核 ANT，本研究的 FUS 施打焦點範圍涵蓋大部分 CM 與 ANT 中的 IAM，對於刺激 CM 或 ANT 的神經調控效果比較，在過往文獻也有諸多探討。

在 Fisher 等人的研究中，DBS 刺激 ANT 的益處往往隨時間增加，在植入後通常 1-2 年內達到最大效果。典型的癲癇發作頻率減少大約為 40%，經過幾年後可達 50-69%，癲癇的嚴重程度可能也會減輕 [59]，另一項研究表明 DBS 刺激 ANT 刺激在三個月內將癲癇發作減少了 40.5%，在無對照階段，五年內減少了 75%，但其副作用包括刺激感覺異常、急性出血、感染、偶爾增加癲癇發作以及通常對情緒和記憶產生短暫影響 [67]。

RNS 刺激 CM 對全面性癲癇能有效的抑制，可降低 67% - 75% 的發作頻率 [67]；Cukiert 等人的研究用 DBS 刺激 CM，百分之九十的患者減少 50% 的癲癇頻率，其中一名患者更是達到了無癲癇發作 [68]；Yang 等人的研究中，14 名患者接受了對 CM 的 DBS，其中 9 例為症狀性全面性癲癇，3 例為原發性全面性癲癇，2 例為雙額葉局部性癲癇，最後隨訪時，癲癇發作頻率的中位數減少 91%，12 名患者癲癇發作頻率減少至少 50%，其中 10 名患者為全面性癲癇，2 名患者為雙額葉癲癇 [69]。



可看到同樣是刺激視丘，刺激 CM 抑制癲癇的效果普遍來說比刺激 ANT 還要顯著，但文獻統計的病患數量、刺激參數的不同、刺激後隨訪期的副作用，都需要更多的研究來比較兩者刺激的抑制效果，以及對生活品質的影響。本研究 FUS 施打於 CM 與 ANT，有 35.9% - 52.9% 的即時抑制效果，略低於 DBS 刺激 CM 的長期發作頻率將低數量 (50%-91%)，相似於 DBS 刺激 ANT 的發作頻率將低數量 (40%-40.5%)。對於超音波刺激 CM 與 ANT，在作用機制上是否與 DBS、RNS 刺激 CM 與 ANT 相同，目前還沒有研究得以證實。FUS 對於刺激兩個腦區的效果差異，是透過刺激 CM 抑制全面性癲癇或是刺激 ANT 透過巴貝茲迴路抑制病灶海馬迴的癲癇，有待進一步實證。DBS、RNS、FUS 皆為抑制癲癇的替代療法，FUS 相較於 DBS、RNS 有著非侵入性的優勢，若能在超音波刺激參數上優化，並設計實驗觀察慢性癲癇動物模型施打 FUS 後的副作用是否強烈，或可進一步證實 FUS 是更好抑制癲癇的神經調控療法。

4.4 fMRI 功能性連結探討癲癇

癲癇的成因至今尚未明確，臨床目前常用高解析度 MRI 結構影像來診斷是否有局部皮質發育不良導致癲癇，或是用 EEG 觀察發作頻率並預測病患的下一次發作可能時間，並從這兩種神經影像去驗證治療方法的可行性。fMRI 在評斷腦區間功能性連結與觀測神經網路，是一項安全且有效的工具，對於結構影像上病灶不明顯的癲癇病患，或能從 fMRI 影像上得到不同的診療結果 [6] [33]。針對癲癇的功能性連結影像，Haneef 等人研究表明 TLE 的病患的 fMRI 分析結果，與海馬迴增加腦區與腦區間功能性連結的腦區，涉及到邊緣系統包含顳葉、島葉、視丘，以及額葉、基底節、腦幹和小腦等；功能性連結減少的腦區，涉及感覺運動皮層（視覺、體感、聽覺、主運動）和預設模式網路區域，這背後可能表明 TLE 涉及廣泛的腦部功能性連結網路失調的現象，或可從腦區與腦區間的功能性連結觀察癲癇病患與正常人腦的差異 [3]。

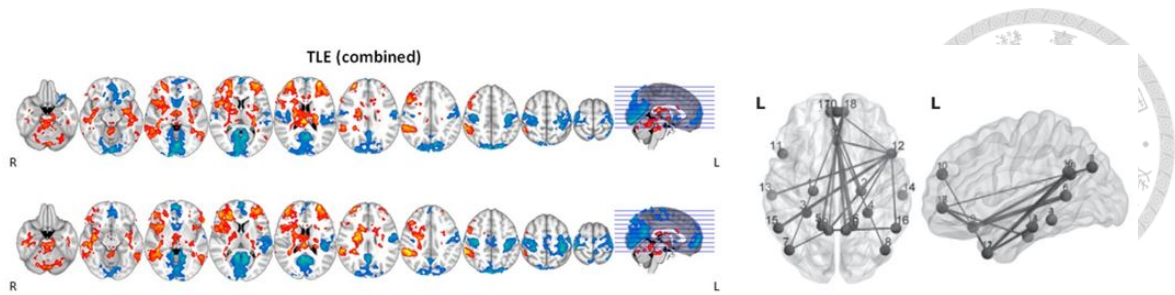


圖 4.1 過往研究探討顳葉癲癇的功能性連結，顳葉癲癇病患的海馬迴，與顳葉、島葉、視丘、額葉、基底節、腦幹和小腦等腦區的功能性連結增加，可從腦區與腦區間的功能性連結觀察癲癇病患與正常人腦的差異 [3]

Sarica 等人於視丘進行 DBS 刺激，在 3 Tesla fMRI 掃描中引起了明顯的 BOLD 響應模式變化，而這種變化在每個患者中隨著活動接觸點的位置而不同。與視丘前核的刺激相關的 BOLD 響應模式特徵為雙側殼核、視丘和後扣帶回皮質的變化，同側扣帶前皮質和楔前葉的變化，對側中央前額皮質和前扣帶皮質的變化，與不同視丘 DBS 參數相關的 BOLD 響應模式提供了機制性的見解，並突顯了在癲癇患者中優化刺激的 fMRI 生物標誌物的可能性 [70]。

針對神經調控抑制癲癇的 fMRI 研究，Diaz 等人於 CM 進行 DBS 的臨床結果，在 80% 的患者中癲癇發作頻率降低 50%，與網狀系統網絡 (Reticular system network) 相互連接的被激發的組織體積密切相關，該網路包括感覺運動和輔助運動皮質，以及小腦、腦幹，儘管在方法上存在差異，但結構和功能連結性都顯示了相同的標靶網路，研究結果表明，對 CM 的 DBS 對於 DRE 的治療效果高度依賴於個體的功能連結性配置，涉及小腦-視丘-皮質迴路 [71]。

本研究藉由在動物模型注射癲癇誘發藥物 PTZ，使動物急性癲癇，在 EEG 與 fMRI 的結果中，可看到 spike 數量與功能性連結皆有上升的趨勢，並隨時間改變。EEG spike 作為診斷癲癇的生物標記 (biomarker)，在臨床診斷上可藉由 spike 發生的腦波分析，來判斷病患是否有癲癇的跡象，但 EEG 需要長時間的監測，且病患沒有發作時有時並無法從 EEG 上觀察出異樣。若能藉由 fMRI 觀察腦神經網路的功能性連結，去觀察正常模型與癲癇模型之間的差異，並與 EEG 做出比較與分析相關性，或能為診療癲癇做出貢獻。

根據第三章的實驗與分析結果，我們推測 EEG spike 與功能性連結，在藥物誘發癲癇後有一定相關性。將 PTZ(+)/FUS(-) 組 EEG spike 與腦區與腦區之間功能性連結隨時間變化的點位製成散布圖，並分析其相關性，如圖 4.2，可見得在藥物誘發全面性癲癇後，EEG spike 與功能性連結呈現高度性相關 ($R=0.66$)，在藥物誘發前的 baseline，在圖表左下角青色區塊，表示較低的 spike 數量 (14.6 至 52.8) 與較弱的腦區與腦區之間功能性連結 C.C.(0.25 至 0.31)；注射藥物誘發癲癇後 10 分鐘，對應的點位在右上角綠色區塊，對應到高 spike 數量 (136.4 至 227.6) 與較強的腦區與腦區之間功能性連結 C.C.(0.51 至 0.79)，且兩者皆會隨著時間，沿著相關性斜直線慢慢傾向左下角的 baseline。

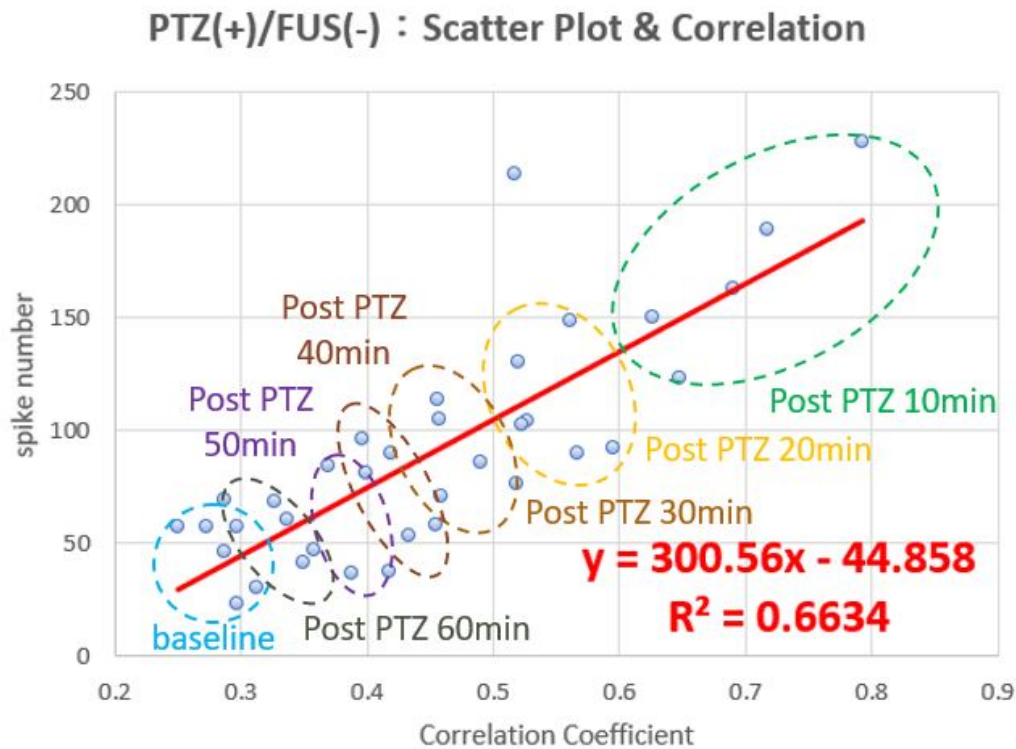


圖 4.2 本研究中 PTZ(+)/FUS(-) 組 EEG spike 與 C.C. 隨時間變化之散布圖與相關性

將 PTZ(+)/FUS(+) 組 EEG spike 與腦區與腦區之間功能性連結隨時間變化的點位製成散布圖，並分析其相關性，如圖 4.3，由於 EEG 與 fMRI 實驗的 PTZ(+)/FUS(-) 組的動物數量不同 (EEG 實驗 8 隻，fMRI 實驗 6 隻)，故去除 EEG 實驗組與平均數值差距最高與最低的 2 隻動物數據，剩下 6 隻動物數據 fMRI 實驗組做

比較。可觀察到不論是在藥物誘發全面性癲癇後，或是 FUS 神經調控後，EEG spike 與功能性連結呈現高度性相關 ($R=0.82$)，在藥物誘發癲癇後 10 分鐘，對應的點位在右上角綠色區塊，對應到高 spike 數量 (76.4 至 189.7) 與較強的腦區與腦區之間功能性連結 C.C.(0.46 至 0.75)；在 FUS 介入治療後，EEG spike 與 C.C. 會沿著相關性斜直線下降至左下角的 baseline 區塊附近。

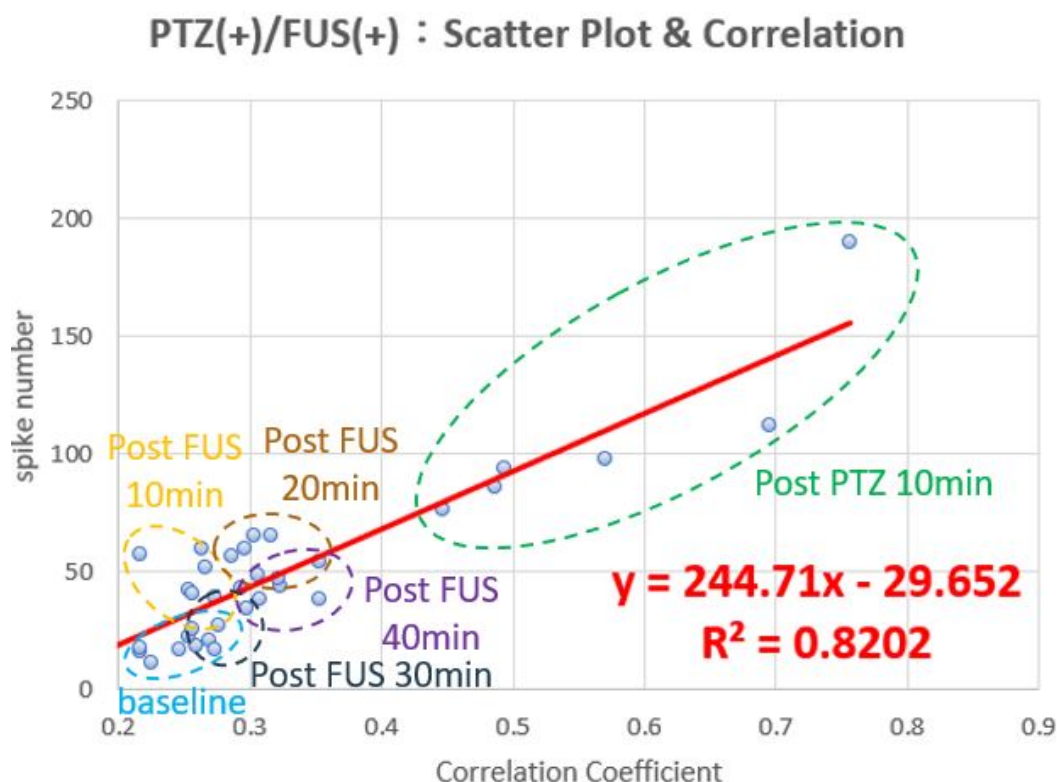



圖 4.3 本研究中 PTZ(+)/FUS(+) 組 EEG spike 與 C.C. 隨時間變化之散布圖與相關性

功能性連結是否可以成為診斷癲癇的一個新生物標記，本研究結果只能得出有潛力的結論，針對生物標記成立的三步驟：發現 (Discovery)、驗證 (Validation)、轉譯 (Translation)，本研究尚在驗證的初期階段，後續研究需要進行一定動物實驗數量的累計，並且為了使 fMRI 測量值得到驗證，相應的 fMRI 測量方法，必須具有精準性與可重複性。每一種測量都需要精確地與電生理數據進行對齊，以確定 fMRI 影像測量與癲癇活動之間的關係。

本研究參考 Vlis 等人的研究，欲藉由 FUS 通過刺激的視丘，藉由巴貝茲迴路



去抑制癲癇病灶海馬迴的不正常放電 [20]，並改變巴貝茲迴路中海馬迴、視丘、杏仁核等腦區的在神經活性上的功能連結性。第三章 fMRI 結果表明，動物模型經由注射 PTZ 後會誘發全腦性癲癇，進而使腦內迴路不正常放電，巴貝茲迴路中的功能性連結亦有顯著升高 (注射後 10 分鐘的 C.C. 由上升 0.24 至 0.58)；在視丘區域施打 FUS 後，可看見不論 Hippo. 連結 Thal.、Hippo. 連結 VPM、VPM 連結 Thal. 的功能性連結皆有顯著的降低 ($p < 0.05$)，但經過 20-30 分鐘後，這些功能性連結有逐漸上升的趨勢。對應 EEG 的統計分析結果，可觀察到 PTZ(+)/FUS(-) 組與 PTZ(+)/FUS(+) 組，EEG spikes 隨時間的變化趨勢與功能性連結 C.C. 隨時間的變化相似，PTZ(+)/FUS(-) 組在 PTZ 注射後的 10 分鐘內達到較高的統計平均，之後數值漸漸邊低，代表藥物誘發癲癇的訊號，可藉由 EEG spike 與功能性連結觀察到；PTZ(+)/FUS(+) 組在經過 FUS 施打視丘後，EEG spike 數量降低，海馬迴、視丘、VPM/VPL 等腦區之間的功能性連結下降，也可觀察出 FUS 可調結迴路內的腦區，改變神經同步興奮的狀態。


我們證實 FUS 確實能對巴貝茲迴路的功能性連結造成影響，將藥物誘發的全腦興奮狀態，一定時間調節為接近正常功能的靜息態腦區。誠如 4.1.2 節所提，調整超音波參數為更多次數的低強度刺激，在 EEG 的結果上能提供更好的抑制效果。目前運用 fMRI 去探討不同超音波參數在癲癇模型上的研究並未成型，本研究藉由建置小動物疾病模型，並可長時間觀測 EEG 與 fMRI，為科研界做出貢獻。

4.5 研究限制與優勢

本研究所建置的動物模型有若干限制：

1. EEG 假影

EEG 量測假影的主要來源，除了動物本身的呼吸與心跳外，源自外在環境的假影來源包含 MRI 儀器的靜磁場與梯度磁場、與超音波探頭連結的功率



放大器和訊號產生器。本研究中 MRI 的靜磁場強度為 7 Tesla，根據試驗結果，會造成相對於 raw EEG 約 5 - 7 倍的高頻假影。有嘗試透過後處理濾波器去過濾雜訊，但成效不彰；當 MRI 掃描序列開啟後，射頻激發線圈會造成相對於 raw EEG 約 15 - 20 倍的低頻假影，且此假影也會於靜磁場造成的假影一同影響 raw EEG。超音波探頭連接訊號產生器與功率放大器，當實驗過程中將探頭放置於動物頭部機構時，接上市電後依然有 3 - 5 倍的高頻假影；相繼開啟訊號產生器與功率放大器，分別造成 5 - 6 倍與 10 - 12 倍的高頻假影。有嘗試將訊號產生器、功率放大器與動物一同做接地，但成效不佳。綜上所述，目前 EEG 與 fMRI 同步量測尚不可行，在 FUS 施打過程中記錄 EEG 也需要改良。

2. fMRI 影像訊號強度

本研究所使用之接收線圈，為了配合電極植入動物頭部以及超音波探頭擺放，故使用單通道中空線圈。在 fMRI 掃描前，會先進行一次 EPI 序列掃描並確認 SNR 至少為 30 再開始進行後續 fMRI 掃描，但頭部傷口含有的空氣、擺放探頭、驅動探頭的傳導線，皆會對 SNR 造成影響。針對頭部傷口含有的空氣，可用填入超音波水凝膠，再透過 ParaVision 5.1 中的 Saturation slices 遮蔽功能去改善；探頭及傳導線造成的訊號影響，本研究調整實驗流程，避免在同時間 FUS 施打與 fMRI 掃描，故 fMRI 掃描期間並不會有探頭擺在動物頭部。

總結本研究所建置的動物模型的優勢：

1. EEG 與 fMRI 的小動物模型

本研究利用 MR 相容白金電極與單通道中空線圈，建置一套小動物模型，可在同一動物模型上觀測 EEG 與 fMRI 兩種神經活性訊號。EEG 觀測腦區可依照需求調整植入位置；fMRI 可同時觀察腦區神經活性與功能性連結。

2. 可存活之藥物誘發癲癇模型

藉由第一點的動物模型，本研究試驗出藥物誘發癲癇的劑量，在 40-70mg/kg 的腹腔注射後，觀測到對照時間不同的發作趨勢。在妥善維持動物生命體徵的設置下，該模型可用於長時間觀測動物疾病模型的神經活性訊號，有利於後續研究或機制探討。

3. 利用該模型驗證超音波神經調控抑制癲癇之成效

我們利用第二點的癲癇動物模型，成功觀察到超音波施於癲癇模型後，抑制癲癇訊號的成果。將來該模型也可應用在超音波神經調控參數的優化，藉由調整 MI、DC、total time 等參數，可在該癲癇動物模型上驗證出最佳的癲癇抑制參數設置。




第五章 結論與未來展望

5.1 結論

在本研究中，我們嘗試使用長時間記錄 rs-fMRI 和 EEG，來觀察藥物誘發癲癇的小動物模型中，聚焦式超音波刺激視丘，引起抗癲癇神經調控效應的可行性。為了能在同一隻動物上記錄並比較 rs-fMRI 和 EEG，我們採用 MR 相容電極植入在深層腦區海馬迴，並量測 EEG 訊號統計 spike 數量，也在 fMRI 影像分析中統計功能性連結相關係數 C.C. 的平均數。所有誘發癲癇的動物模型，癲癇藥物 PTZ 的注射劑量皆為 70 mg/kg。注射癲癇誘發藥物的 PTZ(+)/FUS(-) 組，實驗結果顯示在 PTZ 注射 10 分鐘後，spike 數量由 17.5 上升至 118.8，C.C. 由 0.19 上升至 0.65；spike 數量與 C.C. 隨著時間逐漸降低，在 60 分鐘內 spike 數量降低至 75.8，C.C. 降低至 0.29。

對比 PTZ(+)/FUS(-) 組，注射藥物後施打超音波的 PTZ(+)/FUS(+) 組，在 EEG spike 數量在隨後 40 分鐘內下降 35.9% - 52.9%，C.C. 平均數由 0.63 下降至 0.23，隨後 40 分鐘內數值為 0.23 至 0.31。在 fMRI 腦區對腦區的功能性連結 C.C. 分析中，針對巴貝茲迴路相關腦區，在海馬迴與視丘的功能性連結 C.C. 結果下降 11.4% - 45.1%，海馬迴與視丘腹後內/外側核 C.C. 下降 15.2% - 52.3%，視丘與視丘腹後內/外側核 C.C. 下降 36.6% - 61.8%。可以見得 FUS 刺激視丘除了能藉由神經調控抑制海馬迴的不正常放電之外，對於腦區間功能性連結也有介入影響的效果，該 FUS 參數的刺激可使因藥物誘發而上升的 C.C.，在短時間內顯著降低。



針對神經調控療法的探討，目前 FDA 認可的方法如 DBS、VNS、RNS 等，在即時抑制癲癇發作頻率的效果為 37.9% - 45.0%，對比本研究使用 FUS 的實驗結果 35.9% - 52.9%，有相似的抑制效果，但 FUS 比起上述方法，還具有非侵入性與較高精確性的優勢，具有作為治療癲癇替代療法的高度潛力。然而，FUS 抑制癲癇的施打參數與目標腦區選擇，目前還需要更多的研究與實驗來驗證。比較本研究與過往文獻，FUS 參數在低強度的 MI 值 (0.25) 與足夠的 DC 值 (大於 30%) 的情況下，改為短時間多次施打的 burst-mode，可以獲得更好的抑制效果；目標腦區選擇方面，視丘的 CM 與 ANT 兩個區域做比較，DBS 在 ANT 可透過巴貝茲迴路刺激來抑制癲癇，癲癇發作頻率降低 40%，DBS 在 CM 則是可更好的抑制全面性癲癇 (發作頻率降低 50% - 91%)，本研究的 FUS 焦點區域包含 CM 與 ANT 部分腦區，抑制程度 (35.9% - 52.9%) 也介於 DBS 分別刺激兩腦區的研究結果之間，我們評斷 FUS 刺激 CM 與 ANT 皆可一定程度抑制癲癇，但 FUS 對於刺激兩個腦區的效果差異，有待進一步實證。

針對用 fMRI 功能性連結探討癲癇模型，可由圖 4.2 的相關性觀察出，在藥物注射後 EEG spike 數量與海馬迴-視丘的功能性連結 C.C. 同時上升，再因為藥效隨時間衰退而一同下降的趨勢，且兩者數值呈高度相關性，依照本研究結果可得出海馬迴-視丘功能性連結平均 C.C. 高於 0.36，代表動物模型腦內正在癲癇發作；FUS 治療後海馬迴-視丘功能性連結平均 C.C. 低於 0.31，則代表癲癇已一定程度被抑制。功能性連結是否能作為癲癇的新生物標記，本研究還不能完全證實，尚需要更多實驗並與電生理數據進行對齊來驗證。

總的來說，本研究結果展示了在同一癲癇動物模型中成功整合了長期的 rs-fMRI 監測和 EEG 記錄，以評估注射後藥物誘發的癲癇信號，以及超音波神經調控的抑制癲癇效果；也可從功能性連結的結果觀察腦區與腦區間腦功能連接的變化。本研究的成果能藉由小動物模型為聚焦式超音波的神經調控結果評估帶來增益，並為探討中央神經系統疾病做出科研上的貢獻。



5.2 未來展望

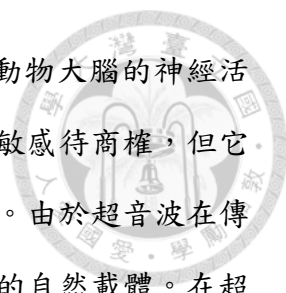
5.2.1 機轉探討

如第一章所提，FUS 改變人腦活動的確切機制大部分尚不清楚，目前廣泛討論的機制分別為空化、溫度變化的熱效應、機械張力。需要注意的是，這些機制可以同時發揮作用，所有神經亞型和實驗範例可能對各種機制具有不同的敏感性。因此，必須檢查所選擇的參數和目標的性質，以了解任何給定機制的預期貢獻，並相應地進行解釋，大部分這些提出的機制是基於對皮質進行的研究。使用不同的 FUS 參數可以提供期望的興奮或抑制效果，具體取決於所需的反應。這與我們通常在癲癇神經生理學中所認為的興奮或抑制有所不同。例如，我們可以想像一些癲癇發作的病灶，我們希望抑制，而其他一些病灶，我們可能希望興奮，尤其是那些具有主要抑制功能的病灶。當目標組織是癲癇發作的病灶時，FUS 的效應似乎使其在一段時間內減少發生癲癇活動，同時保持細胞的完整性 [27]。

1. 空化 (cavitation)

空化可能是超音波神經調節的一個作用機制。超音波空化是指當壓力降至脂溶性區域的汽化點以下時，導致神經元膜內部形成振盪性的氣泡。雖然氣泡在細胞膜內部形成會通過電容變化或細胞膜破裂引起神經調節，但通常使用的有效參數範圍表明，神經活動變化發生在沒有氣泡存在的情況下 [27]。由於汽化和氣泡形成需要時間，增加超音波頻率會在壓力反向之前限制氣泡的生長。然而，有意使用空化參數的治療（低頻和高壓、或注入大氣泡核）已經有效地應用於碎石術、組織碎裂術和血腦屏障開啟。然而，通過成像和計算努力觀察到的典型超音波神經調節實驗中缺乏氣泡的現象，使得研究人員需要探索替代機制。

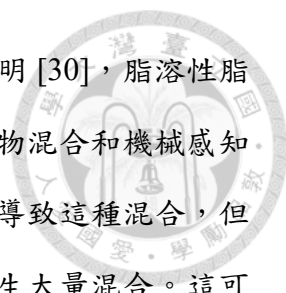
2. 溫度變化的熱效應



許多研究已經證明，在僅有 $+0.1^{\circ}\text{C}$ 的溫度變化下，哺乳動物大腦的神經活動可以被調節。雖然大腦對小於自身自然波動的變化是否敏感待商榷，但它表明大腦可能在局部溫度有變化時，不斷調整其神經活動。由於超音波在傳播過程中會被部分吸收，因此超音波是將熱量傳遞給組織的自然載體。在超音波引起的熱升高後，神經活動可以被可逆性地抑制。儘管對熱神經抑制的機制理解正在研究中，但越來越多的證據支持，增加的鉀通道傳導性在熱效應其中的作用，它降低靜息膜電位，進而抑制神經元的發放。在超音波刺激的背景下考慮到至少有中等程度的熱敏感性的通道類型的多樣性，對大腦及其每個區域及其細胞類型的特徵描述，將提供對熱神經抑制的更深入的理解。最近有關下丘腦中，溫熱和寒冷敏感的溫度調節神經元的發現，可能有助於推動這些更大規模的研究，而丘腦也是超音波神經調節常選為目標的重要腦區。儘管超音波暴露期間溫度升高與其他機械因素的巧合使得超音波神經調節，但熱效應的實際機制還是有些模糊。為了回應這一點，最近的一項研究在麻醉大鼠的視丘中進行了高精度的溫度測量，並發現超音波引起的溫度增加是神經抑制的最佳預測因子，明顯的效應在 $+0.5^{\circ}\text{C}$ 時發生 [29]。重要的是，在其他因素如峰值強度和占空比變化時，這種相關性仍然存在。儘管麻醉狀態下視丘抑制的狹窄範圍不允許將這一發現廣泛應用於其他研究，但它強烈支持了溫度在超音波神經抑制中的作用。

3. 機械張力 (mechanical force)

近來，人們的關注轉向了超音波與脂質膜的機械相互作用，將其視為神經調節的主要機制，特別是為了解釋在溫度有限增加的情況下產生的興奮效應。該理論通常認為，細胞膜的非隨機機械變形，導致通道動力學和膜電容的改變，從而改變興奮性。雖然機械感知是外周感覺系統的廣泛研究特徵，但機械感知並未被廣泛接受為對超音波的一般神經反應 [66]。這可能是由於相關機械感受器的表達較低，以及大腦對機械感知的需求不太明顯。這些研究得出結論，輻射力或動量傳遞到膜上負責增加興奮表現。雖然目前還不清楚作



用於膜上的機械力如何改變通道動力學，但有一種模型表明 [30]，脂溶性脂質微組織在低水平機械力下被分散；這種分散會導致酶底物混合和機械感知通道配體的產生。雖然尚無發表的證據顯示超音波刺激會導致這種混合，但該研究表明，在培養細胞上，流動溶液產生的剪切力會產生大量混合。這可以間接地與壓縮力和產生的剪切波進行比較，或者更直接地，聲波流動也可能在超聲神經調節中起作用。將機械力轉化為神經活動的通道正在進行激烈的研究。腦中表達的機械敏感通道在培養細胞中被超音波有效激活。在同一系統中，機械感受通道並未被超音波激活，但它們在響應溫度時會改變電導。在麻醉小鼠中，發現在運動皮質中，機械感受性鈣離子通道的表達對於尾部運動的超聲刺激是必要的，而該效應需要鈣離子傳導 [27]。總的來說，超音波似乎通過破壞膜的機械作用，引發一系列離子通道調節神經，而通道組成在不同細胞類型之間可能有很大的變化。

本研究中採用低強度的超音波參數進行抑制癲癇的實驗， I_{spta} 為 0.728W，根據過往文獻 [25] 並不容易造成溫度改變；對於空化與機械張力這兩項機制，可藉由組織染色進行機制探討，例如 GAD65 染色為檢測抑制性神經傳導物質 (GABA)、c-Fos 檢測活躍性神經元 [24]、Nissl 觀察和分析神經組織中的細胞核和細胞質結構 [27] 等等。未來若能穩定藥物誘發癲癇劑量與超音波參數設置，針對不同實驗動物，可分別在 FUS 施打後的 10、20、30 分鐘，去進行動物犧牲與組織染色，再將其結果與 EEG、fMRI 進行比對，若 GAD65 與 c-Fos 檢測能對應 fMRI 所分析出的 BOLD 腦區神經活性，意即在組織染色上興奮/抑制性神經皆能在 BOLD map 上找出對應腦區的興奮/靜息程度，則可進一步證實該動物模型的 fMRI 可用於研究癲癇功能性連結與神經網路；在不同時間段取得的組織染色若能對應 EEG 的癲癇抑制程度，也可推導 FUS 神經調節機制的三種之中，哪一種的可能性更高。



5.2.2 封閉迴路超音波控制系統

本研究在同一動物模型中，可量測 EEG 與 fMRI 兩種生理訊號來觀察癲癇發作，其中 EEG 的 spike 為臨床上診斷癲癇的生物標記；透過訊號產生器與功率放大器去驅動聚焦式超音波探頭，於動物模型目標腦區進行超音波施打，也能藉由 EEG 與 fMRI 去觀察神經調控造成的改變。若能透過迴授控制系統 (feedback control system) 去偵測 EEG 訊號，診斷出癲癇後即時施打 FUS，或能達到更即時的神經調控成效，為科研界與醫療界做出貢獻。

針對 FUS 的迴授控制系統，Chien 等人提出一項實驗架構，如圖 5.1，透過被動空化偵測 (passive cavitation detection, PCD) 與迴授控制演算法 (feedback control algorithm) 去達到 FUS 打開血腦屏障 (BBB opening) 的迴授控制系統 [4]。

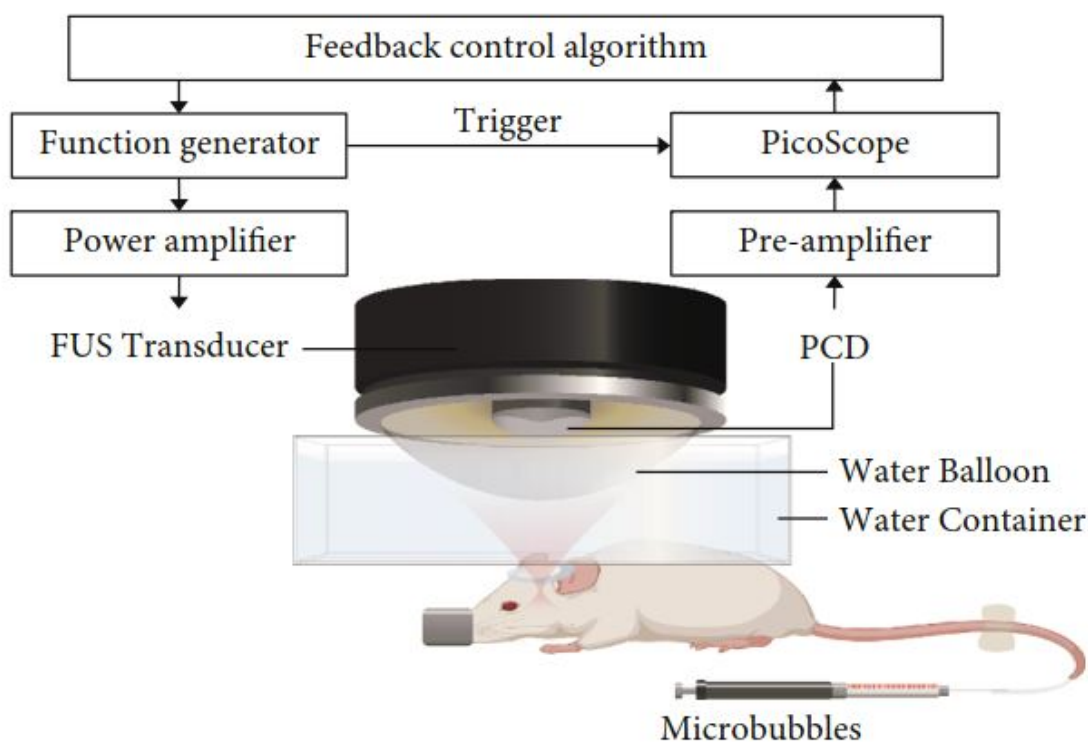



圖 5.1 FUS 打開血腦屏障的迴授控制系統示意圖，由被動空化偵測與迴授控制演算法等技術組成 FUS BBB opening 的迴授控制系統 [4]

控制迴授系統內的演算法，或可透過現場可程式化邏輯閘陣列 (Field Programmable Gate Array, FPGA) 進行，以 EEG 與 fMRI 生理訊號作為輸入，施打

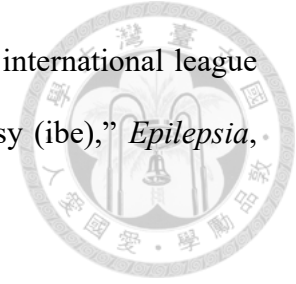


超音波的起始訊號作為輸出，將輸出端接至訊號產生器，如此便能形成迴授控制系統即時對癲癇發作進行神經調控。再者，根據 4.1.2 節提到，足夠 MI 與 DC 的條件下，將 FUS 施打 protocol 改為短時間多次施打，例如將本研究 FUS 的參數調整從 30 秒 ON、90 秒 OFF 改為 90 秒 ON、30 秒 OFF，或可在迴授系統中看見更好的即期癲癇抑制成效。但 EEG 要偵測到多少強度與頻率的訊號可確認為癲癇發作、如何及時濾除呼吸與心跳造成的假影、fMRI 如何即時分析作為輸入訊號、是否需要針對癲癇發作的嚴重程度來即時調整 FUS 參數等等，都需要更多嚴謹的研究與實驗來驗證。



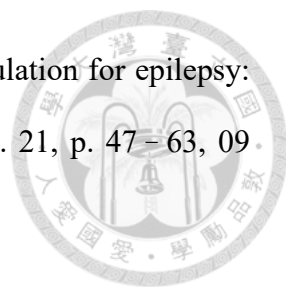
參考文獻

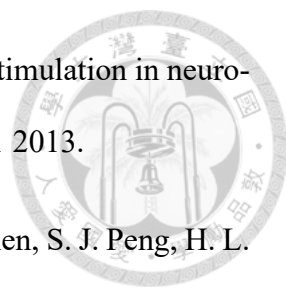
- [1] Y. Y. Chen, H. Y. Lai, S. H. Lin, C. W. Cho, W. H. Chao, C. H. Liaod, S. Tsang, Y. F. Chen, and S. Y. Lin, “Design and fabrication of a polyimide-based microelectrode array: Application in neural recording and repeatable electrolytic lesion in rat brain,” *Journal of Neuroscience Methods*, vol. 182, p. 6–16, 05 2009.
- [2] N. Todd, Y. Zhang, M. Arcaro, L. Becerra, D. Borsook, M. Livingstone, and N. McDannold, “Focused ultrasound induced opening of the blood-brain barrier disrupts inter-hemispheric resting state functional connectivity in the rat brain,” *NeuroImage*, vol. 414-422, 09 2018.
- [3] Z. Haneef, A. Lenartowicz, H. J. Yeh, H. S. Levin, J. E. Jr., and J. M. Stern, “Functional connectivity of hippocampal networks in temporal lobe epilepsy,” *Epilepsia*, vol. 55, no. 1, p. 137–145, 04 2014.
- [4] C. Y. Chien, Y. H. Yang, Y. Gong, Y. M. Yue, and H. Chen, “Blood-brain barrier opening by individualized closed-loop feedback control of focused ultrasound,” *BME Frontiers*, vol. 2022, p. 9867230, 04 2022.
- [5] L. S. Vidyaratne and K. M. Iftekharruddin, “Real-time epileptic seizure detection using eeg,” *IEEE Transactions on Neural Systems and Rehabilitation Engineering*, vol. 25, no. 11, pp. 2146–2156, 01 2017.
- [6] R. S. Fisher, W. van Emde Boas, W. Blume, C. Elger, P. Genton, P. Lee, and J. E. Jr.,

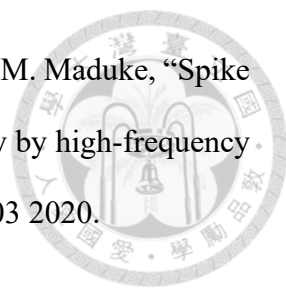


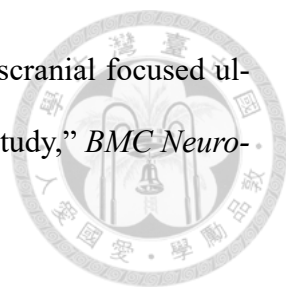
“Epileptic seizures and epilepsy: Definitions proposed by the international league against epilepsy (ilae) and the international bureau for epilepsy (ibe),” *Epilepsia*, vol. 46, no. 4, pp. 470–472, 03 2005.

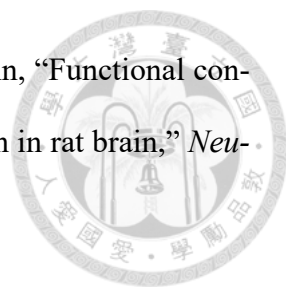
- [7] P. Kwan and M. J. Brodie, “Refractory epilepsy: mechanisms and solutions,” *Expert Review of Neurotherapeutics*, vol. 6, no. 3, pp. 397–406, 01 2014.
- [8] S. Abramovich and A. Bagić, “Epidemiology of epilepsy,” *Neuroepidemiology*, vol. 138, pp. 159–171, 2016.
- [9] K. M. Fiest, K. M. Sauro, S. Wiebe, S. B. Patten, C.-S. Kwon, J. Dykeman, T. Pringsheim, D. L. Lorenzetti, and N. Jetté, “Prevalence and incidence of epilepsy: A systematic review and meta-analysis of international studies,” *Neurology*, vol. 88, no. 3, pp. 296–303, 01 2017.
- [10] R. S. Fisher, J. H. Cross, J. A. French, N. Higurashi, E. Hirsch, F. E. Jansen, L. Lagae, S. L. Moshé, J. Peltola, E. R. Perez, I. E. Scheffer, and S. M. Zuberi, “Operational classification of seizure types by the international league against epilepsy: Position paper of the ilae commission for classification and terminology,” *Epilepsia*, vol. 58, no. 4, pp. 522–530, 03 2017.
- [11] R. Guerrini, C. Marini, and C. Barba, “Generalized epilepsies,” *Handbook of Clinical Neurology*, vol. 161, pp. 3–15, 07 2019.
- [12] T. A. F. Jr, E. H. Middlebrooks, W. H. Tzu, M. R. Neto, and V. M. Holanda, “Post-mortem dissections of the papez circuit and nonmotor targets for functional neurosurgery,” *World Neurosurgery*, vol. 144, pp. e866–e875, 11 2020.
- [13] A. K. Sharma, R. Y. Reams, W. H. Jordan, M. A. Miller, H. L. Thacker, and P. W. Snyder, “Mesial temporal lobe epilepsy: Pathogenesis, induced rodent models and lesions,” *Toxicologic Pathology*, vol. 35, p. 984–999, 07 2007.

- 
- [14] K. L. Dell, M. J. Cook, and M. I. Maturana, “Deep brain stimulation for epilepsy: Biomarkers for optimization,” *Curr Treat Options Neurol*, vol. 21, p. 47–63, 09 2019.
- [15] J. E. Jr, “Introduction to temporal lobe epilepsy,” *Epilepsy Research*, vol. 26, no. 1, pp. 141–150, 12 1996.
- [16] M. Wong, “A critical review of mtor inhibitors and epilepsy: from basic science to clinical trials,” *Expert Review of Neurotherapeutics*, vol. 13, no. 6, pp. 657–669, 01 2014.
- [17] J. E. Jr, “What can we do for people with drug-resistant epilepsy?” *Neurology*, vol. 87, no. 23, pp. 2483–2489, 01 2016.
- [18] B. C. Jobs and G. D. Cascin, “Resective epilepsy surgery for drug-resistant focal epilepsy: A review,” *JAMA*, vol. 313, no. 3, pp. 285–293, 01 2015.
- [19] M. S. Markert and R. S. Fisher, “Neuromodulation - science and practice in epilepsy: Vagus nerve stimulation, thalamic deep brain stimulation, and responsive neurostimulation,” *Expert Review of Neurotherapeutics*, vol. 19, no. 1, pp. 17–29, 04 2018.
- [20] T. A. M. B. van der Vlis, O. E. M. G. Schijns, F. L. W. V. J. Schaper, G. Hoogland, P. Kubben, L. Wagner, R. Rouhl, Y. Temel, and L. Ackermans, “Deep brain stimulation of the anterior nucleus of the thalamus for drug-resistant epilepsy,” *Neurosurgical Review*, vol. 42, pp. 287–296, 01 2019.
- [21] N. R. Williams, K. D. Sudheimer, B. S. Bentzley, J. Pannu, K. H. Stimpson, D. Duvio, K. Cherian, J. Hawkins, K. H. Scherrer, B. Vyssoki, D. DeSouza, K. S. Raj, J. Keller, and A. F. Schatzberg, “High-dose spaced theta-burst tms as a rapid-acting antidepressant in highly refractory depression,” *Brain*, vol. 141, no. 3, pp. e18–e18, 02 2018.

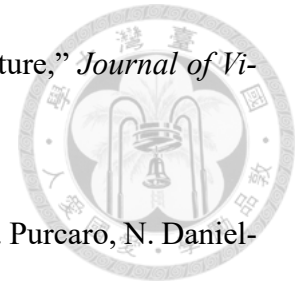
- 
- [22] R. Schulz, C. Gerloff, and F. C. Hummel, “Non-invasive brain stimulation in neurological diseases,” *Neuropharmacology*, vol. 64, pp. 579–587, 01 2013.
- [23] C. C. Lee, C. C. Chou, F. J. Hsiao, Y. H. Chen, C. F. Lin, C. J. Chen, S. J. Peng, H. L. Liu, and H. Y. Yu, “Pilot study of focused ultrasound for drug-resistant epilepsy,” *epilepsia*, vol. 63, pp. 162–175, 10 2022.
- [24] S. G. Chen, C. H. Tsai, C. J. Lin, L. C. Chiac, H. Y. Yu, T. H. Hsieh, and H. L. Liu, “Transcranial focused ultrasound pulsation suppresses pentylentetrazol induced epilepsy in vivo,” *Brain Stimulation*, vol. 13, pp. 35–46, 09 2020.
- [25] P. C. Chu, H. Y. Yu, C. C. Lee, R. Fisher, and H. L. Liu, “Pulsed-focused ultrasound provides long-term suppression of epileptiform bursts in the kainic acid-induced epilepsy rat model,” *Neurotherapeutics*, vol. 19, no. 1, p. 1368–1380, 05 2022.
- [26] B. K. Min, A. Bystritsky, K. I. Jung, K. Fischer, Y. Zhang, L. S. M. and Sang In Park, Y. A. Chung, F. A. Jolesz¹, and S. S. Yoo, “Focused ultrasound-mediated suppression of chemically-induced acute epileptic eeg activity,” *BMC Neuroscience*, vol. 123, no. 23, 03 2011.
- [27] G. Darmani, T. O. Bergmann, K. B. Pauly, C. F. Caskey, L. de Lecea, A. Fomenko, E. Fouragnan, W. Legon, K. R. Murphy, T. Nandi, M. A. Phipps, G. Pinton, H. Ramezanpour, J. Sallet, S. N. Yaakub, S. S. Yoo, and R. Chen, “Non-invasive transcranial ultrasound stimulation for neuromodulation,” *Clinical Neurophysiology*, vol. 135, pp. 51–73, 03 2022.
- [28] S. S. Yoo, A. Bystritsky, J. H. Lee, Y. Zhang, K. Fischer, B. K. Min, N. J. McDannold, A. P. Leone, and F. A. Jolesz, “Focused ultrasound modulates region-specific brain activity,” *NeuroImage*, vol. 56, no. 1, p. 1267–1275, 02 2011.

- 
- [29] M. L. Prieto, K. Firouzi, B. T. Khuri-Yakub, D. V. Madison, and M. Maduke, “Spike frequency–dependent inhibition and excitation of neural activity by high-frequency ultrasound,” *J. Gen. Physiol.*, vol. 152, no. 11, p. e202012672, 03 2020.
- [30] E. N. Petersen, H. W. Chung, A. Nayebosadri, and S. B. Hansen, “Kinetic disruption of lipid rafts is a mechanosensor for phospholipase d,” *Nature Communications*, vol. 13873, no. 7, 12 2016.
- [31] Y. Tufail, . A. Matyushov, N. Baldwin, M. L. Tauchmann, J. Georges, A. Yoshihiro, S. I. H. Tillery, , and W. J. Tyler, “Transcranial pulsed ultrasound stimulates intact brain circuits,” *Neurotechnique*, vol. 66, no. 1, p. 681–694, 06 2010.
- [32] M. Zhang, B. Li, X. Lv, S. Liu, Y. Liu, R. Tang, Y. Lang, Q. Huang, and J. He, “Low-intensity focused ultrasound-mediated attenuation of acute seizure activity based on eeg brain functional connectivity,” *Brain science*, vol. 11, p. 711, 05 2021.
- [33] T. Kim, T. KIM, J. Joo, I. Ryu, S. Lee, E. Park, and Y. Shon, “Modulation of eeg frequency characteristics by low-intensity focused ultrasound stimulation in a pentylenetetrazol-induced epilepsy model,” *IEEE Access*, vol. 9, no. 1, pp. 59 900 – 59 909, 04 2021.
- [34] E. Bubrick, P. J. White, T. Mariano, J. Orozco, M. Purandare, and N. McDannold, “Transcranial focused ultrasound for epilepsy,” *Brain Stimulation*, vol. 14, no. 6, p. 1747, 11 2021.
- [35] L. Ai, J. K. Mueller, A. Grant, Y. Eryaman, and W. Legon, “Transcranial focused ultrasound for bold fmri signal modulation in humans,” *38th Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society (EMBC)*, pp. 1758–1761, 2016.

- 
- [36] L. Ai, P. Bansal, J. K. Mueller, and W. Legon, “Effects of transcranial focused ultrasound on human primary motor cortex using 7t fmri: a pilot study,” *BMC Neuroscience*, vol. 19, no. 56, 09 2018.
- [37] X. M. Chen, D. H. Huang, Z. R. Chen, W. Ye, Z. X. Lv, and J. O. Zheng, “Temporal lobe epilepsy: Decreased thalamic resting-state functional connectivity and their relationships with alertness performance,” *Epilepsy Behavior*, vol. 44, p. 47–54, 01 2015.
- [38] A. Vetkas, J. Germann, G. Elias, A. Loh, A. Boutet, K. Yamamoto, C. Sarica, N. Samuel, V. Milano, A. Fomenko, B. Santyr, J. Tasserie, D. Gwun, H. H. Jung, T. Valiante, G. M. Ibrahim, R. Wennberg, S. K. Kalia, , and A. M. Lozano, “Identifying the neural network for neuromodulation in epilepsy through connectomics and graphs,” *BRAIN COMMUNICATIONS*, vol. 4, pp. 1–15, 04 2022.
- [39] E. H. Middlebrooks, S. S. Grewal, M. Stead, B. N. Lundstrom, G. A. Worrell, , and J. J. V. Gompel, “Differences in functional connectivity profiles as a predictor of response to anterior thalamic nucleus deep brain stimulation for epilepsy: a hypothesis for the mechanism of action and a potential biomarker for outcomes,” *Neurosurg Focus*, vol. 45, pp. E7–E16, 08 2018.
- [40] K. Borges, M. Gearing, D. L. McDermott, A. B. Smith, A. G. Almonte, B. H. Wainer, and R. Dingledine, “Neuronal and glial pathological changes during epileptogenesis in the mouse pilocarpine model,” *Experimental Neurology*, vol. 182, p. 21–34, 02 2003.
- [41] A. C. Ciltas, E. Ozdemir, E. Gumus, A. S. Taskiran, H. Gunes, and G. Arslan, “The anticonvulsant effects of alpha-2 adrenoceptor agonist dexmedetomidine on pentylentetrazole-induced seizures in rats,” *Neurochemical Research*, vol. 47, p. 305–314, 01 2022.

- 
- [42] J. Paasonen, P. Stenroos, R. A. Salo, V. Kiviniemi, and O. Grohn, “Functional connectivity under six anesthesia protocols and the awake condition in rat brain,” *NeuroImage*, vol. 172, p. 9–20, 01 2018.
- [43] B. P. Keogh, D. Cordes, L. Stanberry, B. D. Figler, C. A. Robins, B. L. Tempel, C. Green, A. Emmi, K. Maravilla, and P. A. Schwartzkroin, “Bold-fmri of ptz-induced seizures in rats,” *Epilepsy Research*, vol. 66, p. 75–90, 07 2005.
- [44] G. Lu, X. Qian, J. Castillo, R. Li, L. Jiang, H. Lu, K. K. Shung, M. S. Humayun, B. B. Thomas, and Q. Zhou, “Transcranial focused ultrasound for noninvasive neuromodulation of the visual cortex,” *IEEE TRANSACTIONS ON ULTRASONICS*, vol. 18, no. 1, pp. 21–28, 01 2021.
- [45] G. K. Elbel, R. Kalisch, M. Czisch, R. Hipp, and D. Auer, “Design and importance of a continuous physiologic monitoring for fmri in rats at 7t and first results with the novel anesthetic sevoflurane,” *Proc ISMRM 8th Scientific Meeting*, vol. 928, 01 2000.
- [46] P. Piwowarczyk, E. Rypulak, J. S. Sławecka, D. Nieoczym, K. Socąła, A. Wlaz, P. Wlaz, W. Turski, M. Czuczwar, and M. Borys, “Propofol and sevoflurane anesthesia in early childhood do not influence seizure threshold in adult rats,” *International Journal of Environmental Research and Public Health*, vol. 18, p. 12367, 11 2021.
- [47] N. Todd, Y. Zhang, M. Livingstone, D. Borsook, and N. McDannold, “The neurovascular response is attenuated by focused ultrasound-mediated disruption of the blood-brain barrier,” *NeuroImage*, vol. 201, p. 116010, 07 2019.
- [48] P. L. Yi, S. B. Jou, Y. J. Wu, and F. C. Chang, “Manipulation of epileptiform elec-

trocorticograms (ecogs) and sleep in rats and mice by acupuncture,” *Journal of Visualized Experiments*, vol. 118, pp. 1–8, 12 2016.



[49] M. N. DeSalvo, U. Schridde, A. M. Mishra, J. E. Motelow, M. J. Purcaro, N. Danielson, X. Bai, F. Hyder, and H. Blumenfeld, “Focal bold fmri changes in bicuculline-induced tonic – clonic seizures in the rat,” *NeuroImage*, vol. 50, p. 902 – 909, 01 2010.

[50] J. Luckl, J. Keating, , and J. H. Greenberg, “Alpha-chloralose is a suitable anesthetic for chronic focal cerebral ischemia studies in the rat: A comparative study,” *NIH Public Access*, vol. 1191, p. 157–167, 01 2008.

[51] E. Cagetti, G. Pinna, A. Guidotti, K. Baicy, and R. W. Olsen, “Chronic intermittent ethanol (cie) administration in rats decreases levels of neurosteroids in hippocampus, accompanied by altered behavioral responses to neurosteroids and memory function,” *Neuropharmacology*, vol. 46, p. 570–579, 01 2004.

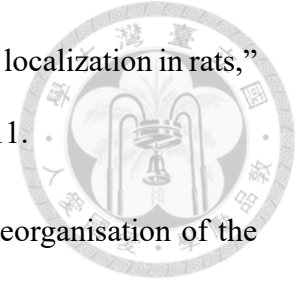
[52] J. D. Kenny, M. B. Westover, S. Ching, E. N. Brown, and K. Solt, “Propofol and sevoflurane induce distinct burst suppression patterns in rats,” *Frontiers in Systems Neuroscience*, vol. 8, pp. 237–250, 12 2014.

[53] Paxinos, George, Watson, and Charles, *The rat brain in stereotaxic coordinates: hard cover edition*. Elsevier, 2006.

[54] M. A. O’ REILLY, A. MULLER, and K. HYNENEN, “Ultrasound insertion loss of rat parietal bone appears to be proportional to animal mass at submegahertz frequencies,” *Ultrasound in Med. Biol.*, vol. 37, no. 11, p. 1930–1937, 07 2011.

[55] P. A. Valdés-Hernández, A. Sumiyoshi, H. Nonaka, R. Haga, Eduardo Aubert-Vásquez, T. Ogawa, Y. Iturria-Medina, J. J. Riera, and R. Kawashima, “An in vivo

mri template set for morphometry, tissue segmentation, and fmri localization in rats,”
Frontiers in Neuroinformatics, vol. 5, no. 26, pp. 24–33, 11 2011.



[56] O. Collignon, M. Davare, E. Olivier, and A. G. D. Volder, “Reorganisation of the right occipito-parietal stream for auditory spatial processing in early blind humans. a transcranial magnetic stimulation study,” *Brain Topography*, vol. 23, pp. 232–240, 01 2009.

[57] G. Liu, N. Slater, and A. Perkins, “Epilepsy: Treatment options,” *Am Fam Physician*, vol. 96, no. 2, pp. 87–96, 07 2017.

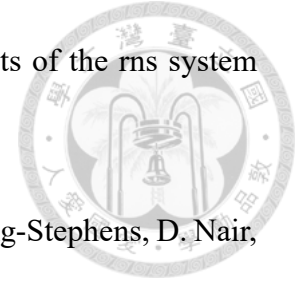
[58] M. S. Markert and R. S. Fisher, “Neuromodulation - science and practice in epilepsy: Vagus nerve stimulation, thalamic deep brain stimulation, and responsive neurostimulation,” *Expert Review of Neurotherapeutics*, vol. 115, no. 1, pp. 17–29, 19 2019.

[59] R. S. Fisher and A. L. Velasco, “Electrical brain stimulation for epilepsy,” *NEUROLOGY*, vol. 10, pp. 261–270, 05 2014.


[60] D. J. Englot, E. F. Chang, and K. I. August, “Vagus nerve stimulation for epilepsy: a meta analysis of efficacy and predictors of response,” *J Neurosurg*, vol. 115, pp. 1248–1256, 12 2011.

[61] C. N. Heck, D. King-Stephens, A. D. Massey, D. R. Nair, B. C. Jobst, G. L. Barkley, V. Salanova, A. J. Cole, M. C. Smith, R. P. Gwinn, C. Skidmore, P. C. V. Ness, G. K. Bergey, Y. D. Park, I. Miller, E. Geller, P. A. Rutecki, R. Zimmerman, D. C. Spencer, A. Goldman, J. C. Edwards, J. W. Leiphart, R. E. Wharen, J. Fessler, N. B. Fountain, G. A. Worrell, R. E. Gross, S. Eisenschenk, R. B. Duckrow, L. J. Hirsch, C. Bazil, C. A. O’ Donovan, F. T. Sun, T. A. Courtney, C. G. Seale, and M. J. Morrell, “Two-year seizure reduction in adults with medically intractable partial onset

epilepsy treated with responsive neurostimulation: Final results of the rns system pivotal trial,” *Epilepsia*, vol. 55, no. 3, p. 432–441, 08 2014.



- [62] G. K. Bergey, M. J. Morrell, E. M. Mizrahi, A. Goldman, D. King-Stephens, D. Nair, S. Srinivasan, B. Jobst, R. E. Gross, D. C. Shields, G. Barkley, V. Salanova, P. Olejniczak, A. Cole, S. S. Cash, K. Noe, R. Wharen, G. Worrell, A. M. Murro, J. Edwards, M. Duchowny, D. Spencer, M. Smith, E. Geller, R. Gwinn, C. Skidmore, S. Eisenschenk, M. Berg, C. Heck, P. V. Ness, N. Fountain, P. Rutecki, A. Massey, C. O’ Donovan, D. Labar, R. B. Duckrow, L. J. Hirsch, T. Courtney, F. T. Sun, and C. G. Seale, “Long-term treatment with responsive brain stimulation in adults with refractory partial seizures,” *American Academy of Neurology*, vol. 84, pp. 810–818, 02 2015.
- [63] H. Hakimova, S. Kim, K. Chu, S. K. Lee, B. Jeong, and D. Jeon, “Ultrasound stimulation inhibits recurrent seizures and improves behavioral outcome in an experimental model of mesial temporal lobe epilepsy,” *Epilepsy Behavior*, vol. 49, pp. 26–32, 05 2015.
- [64] J. Zou, L. Meng, Z. Lin, Y. Qiao, C. Tie, Y. Wang, X. Huang, T. Yuan, Y. Chi, W. Meng, L. Niu, Y. Guo, and H. Zheng, “Ultrasound neuromodulation inhibits seizures in acute epileptic monkeys,” *iScience*, vol. 23, p. 101066, 05 2020.
- [65] Z. Lin, L. Meng, J. Zou, W. Zhou, X. Huang, S. Xue, T. Bian, T. Yuan, L. Niu, Y. Guo, and H. Zheng, “Non-invasive ultrasonic neuromodulation of neuronal excitability for treatment of epilepsy,” *Theranostics*, vol. 10, no. 12, pp. 5514–5526, 01 2020.
- [66] T. J. Manuel, J. Kusunose, X. Zhan, X. Lv, E. Kang, A. Yang, Z. Xiang, and Charles F. Caskey, “Ultrasound neuromodulation depends on pulse repetition frequency and can modulate inhibitory effects of ttx,” *Scientific Reports*, vol. 10, p. 15347, 01 2020.

- 
- [67] R. S. Fisher, “Deep brain stimulation of thalamus for epilepsy,” *Neurobiology of Disease*, vol. 179, p. 106045, 02 2023.
- [68] A. Cukiert, C. M. Cukiert, J. A. Burattini, and P. P. Mariani, “Seizure outcome during bilateral, continuous, thalamic centromedian nuclei deep brain stimulation in patients with generalized epilepsy: a prospective, open-label study,” *Seizure: European Journal of Epilepsy*, vol. 81, p. 304–309, 08 2020.
- [69] P. F. Yang, M. A. Phipps, S. Jonathan, A. T. Newton, N. Byun, J. C. Gore, W. A. Grissom, C. F. Caskey, and L. M. Chen, “Bidirectional and state-dependent modulation of brain activity by transcranial focused ultrasound in non-human primates,” *Brain Stimulation*, vol. 14, pp. 261–271, 01 2021.
- [70] C. Sarica, K. Yamamoto, A. Loh, G. J. Elias, A. Boutet, R. Madhavan, J. Germann, A. Zemmar, D. Gwun, J. Tasserie, D. M. Andrade, M. Hodaie, S. K. Kalia, R. A. Wennberg, and A. M. Lozano, “Blood oxygen level-dependent (bold) response patterns with thalamic deep brain stimulation in patients with medically refractory epilepsy,” *Epilepsy Behavior*, vol. 122, p. 108153, 06 2021.
- [71] C. V. T. Diaz, G. González-Escamilla, D. Ciolac, M. N. García, P. P. Rivas, R. G. Sola, A. Barbosa, J. Pastor, L. Vega-Zelaya, and S. Groppa, “Network substrates of centromedian nucleus deep brain stimulation in generalized pharmaco-resistant epilepsy,” *Neurotherapeutics*, vol. 18, p. 1665–1677, 04 2021.