

SD rat 망막신경절세포의 생후 성숙기간에 따른 빛 자극 반응 특성

충북대학교 의과대학 생리학교실

예 장 희 · 구 용 숙

한국형 인공시각장치 개발 목적으로 토끼망막을 사용하여 차후 개발될 인공시각장치에 인가하기 위한 적절한 전기자극 파라미터를 추출하는 실험을 수행하였다. 유전적 망막변성모델인 RD mouse (*rd/rd* (C3H/HeJ))를 망막질환모델로 사용하기 앞서 본 연구에서는 SD rat을 사용하여 설치류의 생후성숙기간 동안 변화하는 망막신경절세포의 빛 자극에 대한 변화 양상을 전반적으로 파악하는 control 실험을 하였다. 망막신경절세포의 흥분파는 8×8의 MEA (multi-electrode array)로 기록하였다. 개안 이전시기(pre-eye opening period)인 생후 15일까지는 망막신경절세포의 자발적 집단발사현상(moving spontaneous bursts)이 옮겨 다니는 것을 발견하였다. 이 시기의 쥐들은 시각기능이 완성되지 않아 빛 자극에 의해 유발되는 흥분파를 보이지 않으며 오로지 이들의 촉각(tactile sense)에 의해서만 이동하는 것을 관찰하였다. 그러나 생후 2주(post-eye opening period)가 지나면, 빛 자극에 의해 ON, OFF, ON/OFF 반응이 유발됨을 확인할 수 있었다. 전체적인 ON, OFF, 그리고 ON/OFF 망막신경절세포의 양상은 각각 40%, 50%, 5%였으며, 이들 세포가 확인된 안구에서의 해부학적인 위치는 등쪽 관자방향(dorso-temporal)이 50%, 배쪽 방향(ventral)이 37.5%, 그리고 등쪽 코 방향(dorso-nasal)이 12.5%로 나타났다. 설치류 망막을 대상으로 빛 자극에 의한 반응을 알아보는 실험을 할 때 생후 2~3주령이 가장 적합한 시기임을 확인하였다.

중심단어: 망막신경절세포, 생후성숙기간, 망막변성모델

서 론

인공시각장치를 이용하여 손실된 시각을 복원하려는 연구가 1980년대 이후 세계 여러 나라에서 진행되어 오고 있다. 인공시각장치를 통하여 의미 있는 시각을 전달하기 위해서는 다음과 같은 선행요건이 충족되어야 한다. 1. 눈의 내부 또는 외부에 장착될 전자장치의 디자인 및 개발, 2. 생체적합성이 뛰어난 소재의 선택, 3. 눈의 내부에 장착될 전자장치에 동력과 신호를 전달하는 방법 디자인, 4. 장치를 손상없이 눈 내부에 장착, 고정하기 위한 안과수술의 개발, 5. 전자장치에 인가할 적절한 전기자극 파라미터의 추출, 6. 망막에서 대뇌피질까지의 시각정보 처리 기전에 대한 기초 연구를 들 수 있다.¹⁾ 1~3번 영역은 전자공학 및 조직공학자가 담당할 영역이며, 4번은 안과외사가 담당할

영역이며, 5~6번 영역은 전기생리학자가 담당할 영역이다. 이와 같이 인공시각장치를 개발하기 위해서는 공학과 의학의 접목이 절대적으로 요구되는 바이며 현재 국내에서도 한국형 인공시각장치 개발 연구진이 활동 중이다.

한국형 인공시각장치 개발 연구진의 일원으로서 지금까지 본 연구실에서는 토끼, (New Zealand white rabbit), 망막을 사용하여 차후 개발될 인공시각장치에 인가하기 위한 적절한 전기자극 파라미터 추출을 목표로 하여, ON-pathway만을 선택적으로 차단시키는 APB (1-amino-4-phosphonobutyric acid)를 사용하여 화학적 변성을 유도함으로써 완전하지는 않으나 퇴행성망막질환과 유사한 조건을 만들어 실험하였다.²⁾

유전적 망막변성모델인 RD mouse (*rd/rd*, C3H/HeJ)의 경우, 유전적인 결함에 의하여 성장기간 중 이유기 이후에 시세포와 양극세포가 급격히 퇴행되어 극히 일부만 남는 반면 비교적 신경절세포층은 보존되는 특징을 보이는 - 인간에서 나타나는 망막 색소변성증(retinitis pigmentosa)과 유사한 조건인 - 망막 변성이 발현되기 때문에 인공시각장치와 관련된 연구에 사용할 수 있는 적절한 모델로 생각되어 왔다.³⁾

그러나 토끼와는 달리 설치류에서는 시각 선조(visual streak)

본 논문은 한국학술진흥재단 지역우수 연구비(R05-2004-000-11440-0)지원에 의한 결과임.

이 논문은 2005년 12월 3일 접수하여 2005년 12월 21일 채택되었음.

책임저자: 구용숙, (361-763) 충북 청주시 흥덕구 개신동 산 48번지
충북대학교 의과대학 생리학교실
Tel: 043)261-2870, Fax: 043)272-1603
Email: ysgoo@chungbuk.ac.kr

가 관찰되지 않을 뿐만 아니라 황반부와 같이 시세포가 밀집되어 있는 구역이 없다는 해부학적 차이 이외에도 종간 차이에 기인한 기능적 차이도 있으리라 판단된다.

따라서 기존의 토끼망막을 사용한 연구에서 RD mouse 망막연구로 실험대상을 전환함에 있어 본격적으로 RD mouse를 사용하기 전에 설치류 망막의 제반 특성을 알아보는 대조실험이 요구되는데, 본 연구에서는 SD rat 망막을 사용하여 생후 성숙기간에 따라 빛 자극에 대한 망막신경절세포의 반응을 기록한 결과 그 반응 양상이 다르게 나타났음을 보고한다.

재료 및 방법

1. 망막의 분리

실험에 사용된 SD rat은 각각 12시간 간격으로 암(dark)/빛(light) semi-SPF 조건에서 사육되었으며, 실험 전 하루 동안 SD Rat을 암적응시켰다. 각 일령별(12~34일)로 실험을 실시하였다. 렘폰(Xylazine hydrochloride, 한국 바이엘)과 케타라(염산 케타민, 유한양행) 혼합 용액(케타라 0.2 ml/100 g; 렘폰 0.083 ml/100 g)을 복강 주사하여 SD rat을 마취시킨 후 양쪽 안구를 적출하였다. 적출한 안구에 이후 인공 뇌척수액(artificial cerebrospinal fluid, ACSF solution)(단위: mM, 124 NaCl, 10 glucose, 1.15 KH₂PO₄, 25 NaHCO₃, 1.15 MgSO₄, 2.5 CaCl₂, 5 KCl; 7.4 pH)을 주입하면서 다음의 방법으로 망막 절편을 얻었다. 1) 먼저 망막의 전면에 있는 구조물(각막, 수정체, 초자체)을 모두 제거하였다. 2) 주사기를 사용하여 인공 뇌척수액을 주입하여 망막과 공막 사이의 틈을 벌림으로써 공막으로부터 망막을 분리하였고 최종적으로 시신경이 부착되어 있는 부위를 가위로 잘라줌으로써 얇은 투명종이 형태의 망막(두께 ~200 μm)을 얻어낼 수 있었다. 3) 망막을 전극에 붙이기 적합한 크기(0.5×0.5 cm)로 자른 후, 신경절세포 부위가 전극 쪽을 향하도록 뒤집어 붙이고 망막 절편 전체에서 흥분파를 기록하였다. 실험이 진행되고 있는 동안에는 온도조절기를 통하여 망막의

온도를 32.5°C로 일정하게 유지하면서 흥분파를 기록하였다.

2. 다채널전극(Multi-electrode array, MEA)

망막의 흥분파를 기록하기 위한 전극으로써 MEA (Multichannel systems GmbH, Germany)를 사용하였다. MEA는 5×5 cm의 유리판(glass plate)의 중심부에 8행×8열의 배열로 구성되어 있는 전극이며, 전도층은 TiN로, 절연층은 Si₃N₄로 구성되어 있다. 각 배열소자를 구성하는 전극의 직경은 30 μm이고, 전극간 거리는 200 μm이며, 1 kHz에서 50kΩ 수준의 낮은 임피던스를 갖는다.

3. 빛 자극 방법(Fig. 1)

빛 자극 소프트웨어는 실험실에서 자체적으로 제작하여 사용하였으며, 점(spot) 자극, 막대(bar) 자극, 무작위(random checker board) 자극을 줄 수 있다. 자극 패턴은 암실에서 컴퓨터 모니터를 통하여 출력되어 볼록렌즈(lens 1)를 통과하면서 상이 축소되고, 표면 반사형 거울(surface mirror)로 방향 전환이 이루어진다. Lens 2는 MEA 크기에 맞도록 모니터 영상을 축소하는 역할과 선명한 영상이 제공되도록 초점을 조절하는 역할을 한다. 빛 자극 시점을 동기화하기 위하여 RS232 interface의 출력을 데이터 획득 소프트웨어(MC_Rack)에 아날로그 신호로 넣어 주었다. 모니터에서 나온 빛이 최종적으로 MEA에 입사될 때의 강도를 IL1400A Photometry (International Light Inc., USA)로 측정하여 실제 실험에는 강도 1.45 μW/cm²인 점 자극이 전체 64채널에 모두 인가되도록 하였다. ON 2초, OFF 5초의 빛 자극을 반복적으로 인가하면서 10분 동안 신경절세포의 흥분파를 기록하였다.

4. 데이터 획득 및 분석

신호 기록을 위한 시스템으로는 MEA60 system (Multichannel systems GmbH, Germany)을 사용하였다. MEA60 system은 크게 1. 통합형 60채널 증폭기 및 필터(pre- and filter-

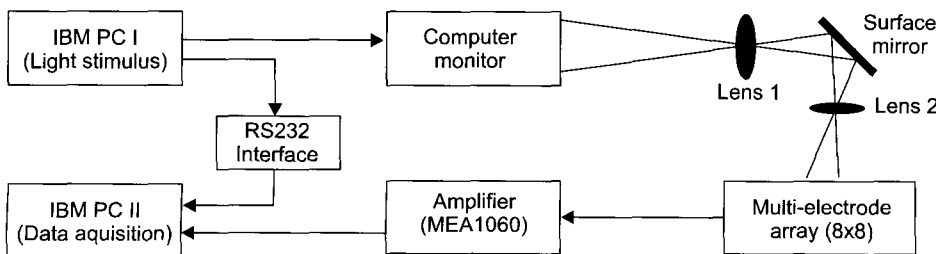


Fig. 1. Schematic diagram of light stimulation and data acquisition system. The stimulation pattern out of computer monitor is applied to MEA through two lenses and mirror. RS232 interface is for synchronization of visual stimulation and data acquisition.

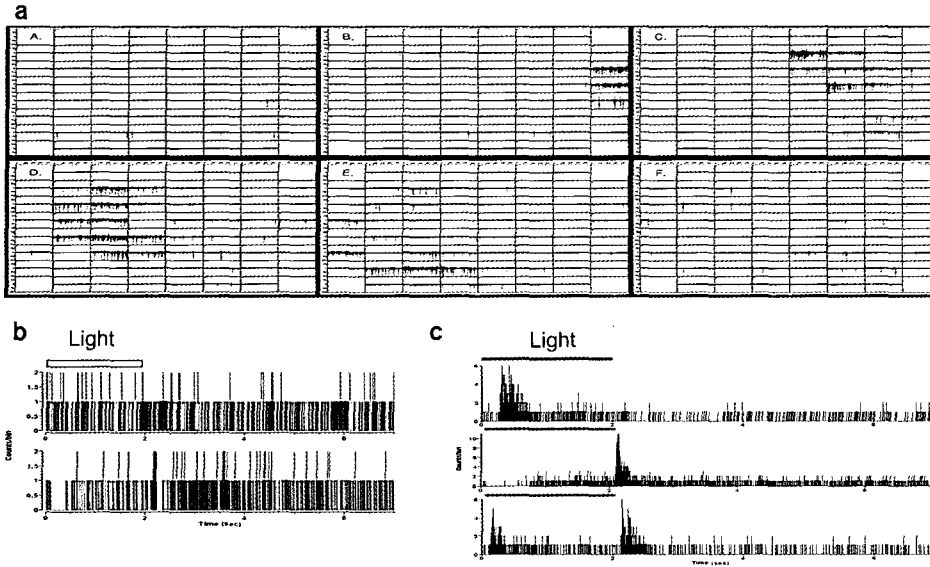


Fig. 2. Responses of retinal ganglion cells to periodic flashes (ON: 2 sec, OFF: 5 sec). (a) Retinal pieces before postnatal day 14 show moving spontaneous bursting activity. Each panel of A to F shows recording window of same retinal piece with different time. A: 0 sec, B: 6 sec, C: 16 sec, D: 26 sec, E: 32 sec, F: 40 sec after recording start. (b) PSTH from the raw data A. No ON, OFF, and ON/OFF responses were evoked. (c) Three types (ON cell, OFF cell, and ON/OFF cell) of retinal ganglion cells classified with PSTH. These three cells are obtained from the retinal piece of PD 22.

amplifier)인 MEA 1060 부분(증폭도: $\times 1,200$, band pass filter: 10~3000 Hz)과 2. PC를 기반으로 한 데이터 획득 소프트웨어 부분의 두 부분으로 구성되어 있다. 이 시스템이 제공하는 최대 표본화 속도는 50 kHz/channel이며 본 실험에서는 25 kHz/channel을 사용하였다. 데이터 분석은 Offline sorter™ (Plexon Inc., USA)의 주성분분석 방법을 이용, 파형을 구분하였고, NeuroExplorer™에서 제공되는 PSTH (Post-stimulus time histogram) 분석 방법을 이용하였다.

1) PSTH (Post-stimulus time histogram)

자극을 인가 후 자극으로 인해 유도된 신경세포의 흥분 발사도를 시간 축에 표시하여 나타낸다.

결 과

1. 생후 성숙(Postnatal maturation)되면서 나타나는 망막 신경절세포의 특성

생후 성숙에 따른 망막신경절세포의 특성을 파악하여 보았다. 생후 12일부터 32일 사이의 SD rat을 관찰한 결과 생후 2주 가량 되면 눈꺼풀이 열리는 이른바 개안시기가 된다. 개안이 되는 시기를 기점으로 개안 전(pre-eye opening period)과 개안 후(post-eye opening period)의 망막신경절세포 양상이 다르게 나타남을 확인하였다.

개안 전에는 단지 무작위적인 파형이 일정 시간을 주기로 나타나며, 이른바 자발적 집단발사(spontaneous bursting activity)가 시간에 따라 이곳저곳으로 불특정하게 움직이는 것이 관찰된다(Fig. 2a). 또한 이 시기에는 빛 자극이 인가

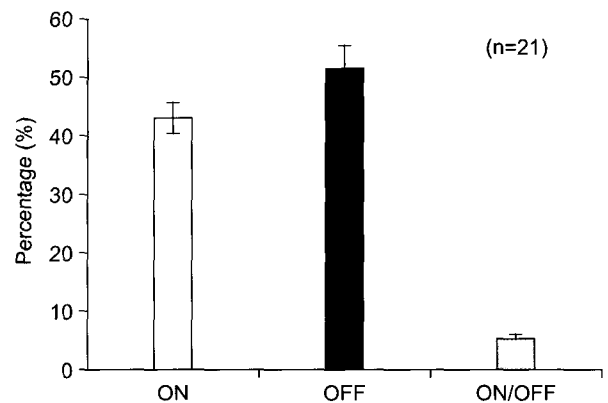


Fig. 3. The fractional distribution of ON, OFF, and ON/OFF ganglion cell in SD rat. Data were pooled from 21 retinal pieces.

되어도 빛에 의하여 유발되는 ON, OFF, ON/OFF 반응이 나타나지 않는다(Fig. 2b). 그러나 개안 이후인 2주 이상 지나면 개안 이전의 자발적 집단발사는 없어지는 반면, 빛 자극에 의해 유발되는 ON, OFF, 그리고 ON/OFF 반응들이 나타난다(Fig. 2c).

2. 3가지 망막신경절세포의 유형 분포

본 실험에서 PSTH를 통해 얻은 SD rat 망막신경절세포의 유형 분포와 토끼 망막신경절세포의 유형분포간에는 차이가 있었다(Fig. 3). 토끼에서는 ON cell, OFF cell 그리고 ON/OFF cell의 분포양상은 거의 비슷했으나[ON; 35%, OFF;

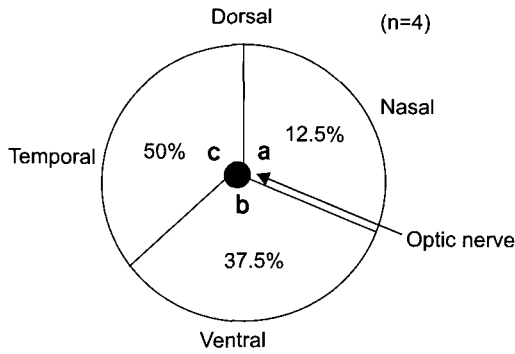


Fig. 4. The percentage (%) of light evoked response in 3 anatomical areas of eye. Data were pooled from 4 eyes. 50% of total responses were from dorso-temporal side of eye, 12.5% from dorso-nasal side and 37.5% from ventral side of eye. More details of light evoked ganglion cell response in area (a) ON: 50%, OFF: 50%, ON/OFF: 0%, in area (b) ON: 31%, OFF: 64%, ON/OFF: 5%, and in area (c) ON: 41.7%, OFF: 50%, ON/OFF: 8.3%.

30%, and ON/OFF 35%],⁴⁾ SD rat에서는 ON, OFF 그리고 ON/OFF cell이 각각 약 40%, 55% 그리고 5%로 ON, OFF ganglion cell에 비하여 ON/OFF ganglion cell의 분포가 극히 적게 나타났다. 또한 망막신경절세포의 안구 내 분포 양상 역시 토끼에서는 시각 선조를 중심으로 ON, OFF, 그리고 ON/OFF 반응이 대부분 균등하게 분포되어 있었으나, SD rat의 경우 안구 내 분포 양상도 안구의 위치에 따라 dorso-temporal site; 50%, dorso-nasal site; 약 13%, 그리고 ventral site; 약 38% 대로 다르게 나타났다(Fig. 4).

3. 시기별로 관찰되는 빛자극 유발 세포 반응도

생후 21~32일의 데이터를 관찰한 결과, 생후 14일 이후부터 빛 자극 인가시 ON, OFF, ON/OFF 반응 양상이 나타나기 시작하였다. 이러한 반응 양상이 나타나는 비율은 생후 23일까지 약 80%에 이르지만, 평균적으로 23일이 지나고 나서는 반응 비율이 감소하여 생후 32일 이상 되면 반응 비율이 20% 이하로 나타났다(Fig. 5).

결론 및 고찰

본 실험을 통하여 설치류 망막에서 관찰되는 망막신경절세포 특성이 다음과 같음을 알 수 있었다.

1. 개안 전 시기의 망막신경절세포 특성

생후 2주까지는 눈꺼풀(eyelid)이 서로 붙어 있어 눈을 뜨

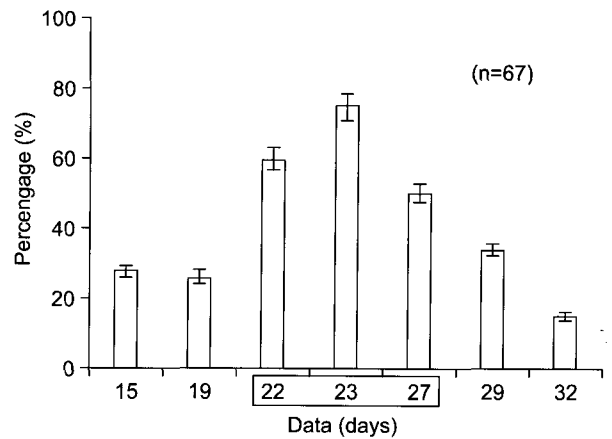


Fig. 5. The percentage (%) of light evoked response for each indicated postnatal day. After postnatal day of 32, light evoked ON, OFF, and ON/OFF response decreased less than 20%. The peak percentages were observed between 22 and 27 postnatal days. Data were pooled from 67 retinal pieces.

지 못하는 이른바 개안이 되지 못하는 상태이다. 개안이 완전히 이루어지지 못한 상황에서는 오로지 이들의 축삭과 후각만을 이용하여 이동하는 것을 관찰하였으며 이로 미루어 볼 때 시각은 거의 기능하지 못하는 것으로 판단된다. 이 시기의 망막은 중추 신경과 신호를 주고받으며 망막과 시냅스를 이루는 중추의 다른 신경세포와의 시냅스연결을 정립하기 위하여 자발적 집단발사를 하는 것으로 알려져 있다.⁵⁾ 또한 설치류에서 생후 2주간은 ON, OFF pathway가 정립되는 시기이기도 하다.⁶⁾ McLaughlin 등⁷⁾이 행한 생후 발달시기 중 임계기(critical period)라 불리는 생후 2주 동안 망막의 자발적 집단발사와 망막체절성지도(retinotopic map)와의 관계를 알아보는 연구에서 니코틴성 아세틸콜린 수용체(nicotinic acetylcholine receptor)의 subunit인 $\beta 2$ subunit가 결여된 mice ($\beta 2^{-/-}$)에서는 생후 첫 주에 망막파가 존재하지 않음을 보고하였다. 또한 생후 8일의 정상(wild-type) 생쥐에서는 망막으로부터 중뇌의 상소구(superior colliculus)로 가는 retinocollicular projection은 근접한 망막신경절세포의 축삭이 서로 겹쳐져 국소적인 종말부(focal termination zone)를 형성하면서 아주 다듬어진 지도를 만드는 반면, $\beta 2^{-/-}$ 의 생쥐에서는 망막신경절세포의 축삭이 넓게 퍼져 넓은 종말부를 형성하였고 이러한 넓은 종말부는 잘 다듬어진 지도로 리모델링되는 데 실패함을 보고하였다. 즉 자발적 집단발사에 의해 아주 다듬어진 망막체절성지도가 만들어진다는 것이 밝혀졌다.

시냅스연결 정립을 위한 자발적 집단발사 현상은 설치류

의 생후 성숙시기에만 국한된 것이 아니라 토끼에서도 관찰되나 설치류와는 다른 형태로 나타남이 보고되었다.⁸⁾ 즉 첫째, 시냅스 형성 이전 시기에 빈번하고 빠르게 공간적인 구분 없이 나타나는 파형(stage 1), 둘째, stage 1보다는 낮은 빈도와 느린 속도를 지니고 인접한 파형과 경계를 이루며 이후에 나타나는 파형에 대하여 불응기를 가진 파형(stage 2), 셋째, 생후 3~4일 사이 글루타메이트 수용체(glutamatergic receptor)와 무스카린 수용체(muscarinic receptor)의 상호작용에 의해 나타나는 파형(stage 3)이 그것이다.

본 연구에서 생후 2주 이내의 SD rat의 망막으로 실험을 하였을 때 토끼에서의 stage 1, 2와 유사한 자발적 집단발사가 나타났으며, 2주 후에는 자발적 집단발사 현상을 관찰할 수 없었다. 다른 연구자의 보고와 같이 생후 2주 동안 시냅스간의 정립이 일어났으리라 추측되며 시냅스의 정립이 완성된 이후에는 자발적 집단발사가 소실되었다고 생각된다.

2. 개안 후 망막신경절세포 특성

개안 전과는 달리 개안이 되고 난 후인 생후 2주 이후부터는 각 시냅스간의 정립이 끝난 상태로, 빛 자극에 의해 ON, OFF, 그리고 ON/OFF 반응이 유발되었다. 그러나 토끼의 망막에서와는 달리 SD rat의 망막에서 다음과 같은 세 가지 차이점이 나타났다. 첫째 ON, OFF, 그리고 ON/OFF 유형의 균등한 망막신경절세포의 반응이 나타난 것이 아니라 주로 ON과 OFF 신경절세포로만 편중되어 나타났으며, 둘째로 안구의 위치마다 망막신경절세포 유형의 분포가 다르게 나타났다(Fig. 4). 마지막으로 이와 같은 반응들이 즉각 나타나는 것이 아니라, 점차 증가하여 23일경에 이르러

서야 최대반응을 나타냈다(Fig. 5). 그러나 생후 23일 이후 나타나는 반응 양상은 오히려 감소하는 추세를 보였다.

이상의 결과로 미루어 볼 때 개안이 시작된 생후 2주 이후부터 약 3주 사이가 설치류에서 망막신경절세포 연구를 하기에 가장 적절한 실험 시기로 판단된다.

참 고 문 헌

1. Margalit E, Maia M, Weiland JD, et al: Retinal prosthesis for the blind. *Surv Ophthalmol* 47:335-356 (2002)
2. Jin GH, Ye JH, Lee TS, Goo YS: Electrical stimulation of isolated rabbit retina. *Proceeding of the IEEE Engineering in medicine and biology 27th Annual international conference*. Shanghai, (2005) No. 804
3. An J, Asayama N, Humayun MS, et al: Ganglion cell responses to retinal light stimulation in the absence of photoreceptor outer segments from retinal degenerate rodents. *Curr Eye Res* 24:26-32 (2002)
4. 조현숙, 진계환, 구용숙: 다채널기록법을 이용한 토끼 망막신경절세포의 특성 분석. *의학물리* 15:228-236 (2004)
5. Wong RO: Patterns of correlated spontaneous bursting activity in the developing mammalian retina. *Semin Cell Dev Biol* 8:5-12 (1997)
6. Tian N, Copenhagen DR: Visual stimulation is required for refinement of ON and OFF pathways in postnatal retina. *Neuron* 39:85-86 (2003)
7. McLaughlin T, Torborg CL, Feller MB, Dennis DMO: Retinotopic map refinement requires spontaneous retinal waves during a brief critical period of development. *Neuron* 40:1147-1160 (2003)
8. Syed MM, Lee S, Zheng J, Zhou ZJ: Stage dependent dynamics and modulation of spontaneous waves in the developing rabbit retina. *J Physiol* 560:533-549 (2004)

Characteristics of Light-evoked Retinal Ganglion Cell Activity with Postnatal Maturation in SD Rat

Jang Hee Ye, Yong Sook Goo

Department of Physiology, Chungbuk National University Medical School

As part of Korean retinal prosthesis project, we have provided preliminary experimental results regarding voltage parameters for the stimulation of chemically degenerated rabbit retina. Since our APB-treated chemically degenerated retina is only ON-pathway blocked, now we switch our experiments to more appropriate retinal degeneration model, genetically degenerated retina model (RD mouse: *rd/rd* (C3H/HeJ)). Before studying with RD mouse, we started control experiments with normal SD rat to understand characteristics of retinal ganglion cell activity with postnatal maturation in rodents. Ganglion cell activities were recorded with 8×8 multi-electrode array. Moving spontaneous bursts appeared until postnatal day of 15. During pre-eye opening period, no light evoked response appeared. After postnatal day of 2 weeks (post-eye opening period), ON-, OFF- and ON/OFF response appeared. The fractional distributions of ON, OFF, and ON/OFF ganglion cell is about 40%, 50%, and 5%. The percentage (%) of light evoked response in each dorso-temporal, ventral, and dorso-nasal area of eye is about 50%, 37.5% and 12.5%, respectively. We concluded that the optimal period for experiment in rodent is about postnatal day of 2~3 weeks.

Key Words: Retinal ganglion cell, Postnatal maturation, Retinal degeneration model