

다채널 전극을 이용한 쥐 뇌결핵 내 시상밑핵의 연결성 검증 Investigation on Connectivity of Subthalamic Nucleus in Rat Brain Slice using Multi-Electrode Arrays

*정미지^{1,2}, 추준욱¹, 최규원¹, 서준교¹, 김용훈², #윤인찬¹

*M. J. Jeong¹, J. U. Chu¹, K. Choi¹, J. K. Suh¹, Y. J. Kim², #I. Youn(iyou@kist.re.kr)¹

¹한국과학기술연구원 의공학연구소, ²연세대학교 기계공학과

Key words : Parkinson's disease, Subthalamic nucleus, Multi-electrode arrays, Deep brain stimulation

1. 서론

시상밑핵(subthalamic nucleus: STN)은 신경 신호 연결에 있어 흥분-억제 회로의 폐루프(closed-loop)를 구현하는 중요한 조직으로 알려져 있다. 이는 신경 생리학적으로 글루타메이트성(glutamatergic) 핵으로 기저핵(basal ganglia)에 흥분성 영향을 미친다[1]. 파킨슨 환자에서, 흑질 선조체에 도파민 부족은 기저핵의 발화 패턴 변화를 야기시킨다. 기존의 파킨슨 동물 모델 연구에서 시상밑핵과 기저핵 사이에 동기성을 가진 돌발성 발화 패턴을 나타냄을 밝혔다[2]. 따라서 시상밑핵과 기저핵 사이의 연결성에 대한 이해가 필요하다.

본 연구에서는 다채널전극(multi-electrode arrays: MEA)을 통해 in-vitro 모델을 만들고 약물처리를 통해 시상밑핵의 연결성을 검증하였다. 이는 뇌 심부 자극술(deep brain stimulation: DBS) 혹은 약물전달 시스템 등의 임상적용 가능성을 보여준다.

2. 실험 방법

2.1 뇌 결핵 조직의 준비 및 배양

뇌 조직은 생후 5 일된 Sprague-Dawley rats에서 추출하여 해부용 미디어(media)로 옮긴다. 이를 조직절단기(tissue chopper)에 올려 관상면으로 400 μm 두께로 절편을 준비한다. 시상밑핵이 포함된 뇌 절편은 일정한 간격으로 2~3 개씩 membrane insert 위에 올리고 안쪽의 해부 미디어를 제거한 후 6 well plate 으로 옮긴다. 각 well 에 추가로 1ml Culture media 를 넣어 인큐베이터에서 2~3 일간 배양한다(36°C, 5%CO₂).

2.2 MEA를 이용한 뇌 신경신호의 검출

Figure 1 (a)는 다채널전극 시스템의 실험 설정을 보여주고 있다. Figure 1(b)는 60 개의 다채

널 전극을 보여주고 있으며, 각 채널의 데이터는 25000Hz 샘플링을 통해 얻어진다. TC02(Multichannel systems, Germany)를 통해 온도를 36°C로 유지하며, Peristaltic Pump 를 이용하여 신선한 인공 뇌 척수액(aCSF)을 공급한다(1ml/min). 각 채널은 MC_Rack 프로그램을 사용하여 녹화된다.

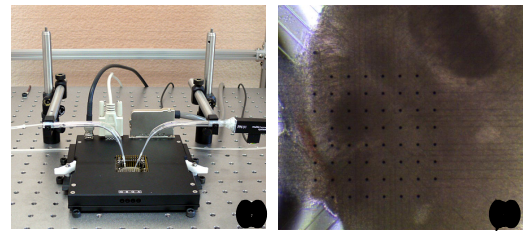


Fig. 1 (a)MEA recording system

(b)MEA recording sites placed over the STN

2.3 약물처리에 따른 STN 신경 신호의 분석

약물 처리에 따른 STN 의 신경 신호의 분석을 위해, 기저핵의 신경전달에 관련된 약물을 사용하였다. 사용된 약물은 크게 antagonist 와 agonist 로 나뉜다. Antagonist 약물은 DL-2-amino-5-phosphonopentanoic acid (APV), bicuculline, haloperidol hydrochloride 이며, agonist 약물은 NMDA, GABA, dopamine 을 사용하였다.

2.4 데이터 분석

약물 처리에 따른 대조군과 실험군은 채널 별 시간 당 활동전위 수를 측정·비교하였다. 돌발성(burst)에서 긴장성(tonic) 또는 긴장성에서 돌발성으로 변하는 신경 신호의 패턴은 발진주파수(oscillation frequency)와 돌발성 주파수(burst frequency)의 상관관계로 나타낼 수 있다.

모든 데이터는 평균 ± 평균의 표준오차(S.E.M.)로 나타났다. 데이터 분석은 분산분석: 반복 없는 이원배치법을 사용하였다.

3. 결과

3.1 대조군에서의 단일 스파이크

총 51 개의 조직에서 251 개의 자발적 신호를 검출하였다. 이 중 149/251 개(59%)에서 돌발성 신호가 발생했으며, 102/251 개(41%)에서 긴장성 신호가 발생하는 것을 볼 수 있었다. 돌발성 활동 전위는 STN 내의 다채널에서 동기성을 가지며, 주파수는 9.2 ± 0.7 Hz 이고 긴장성의 주파수는 3.2 ± 0.4 Hz 이다.

3.2 Glutamate, GABA, dopamine antagonist 가 STN 파형에 미치는 영향

11 개의 긴장성 파형을 나타내는 전극부는 glutamate antagonist 인 APV 로 처리한 후 활동전위 주파수가 $70.2 \pm 9.3\%$ 만큼 감소 하였고 20 개의 동기성을 가지는 돌발성 파형은 APV 처리 후 $86.6 \pm 3.7\%$ 만큼 감소 하였으며 그 패턴이 돌발성에서 긴장성으로 변했다(Fig 2). 27 개의 전극부에 GABA_A antagonist 인 bicuculline 을 처리한 결과 발화 빈도에서 유의한 차이를 보이지 않았으며(3.7 ± 0.9 to 2.5 ± 0.4 Hz) dopamine antagonist 인 haloperidol 은 10 개의 긴장성 전극부에서 $27.5 \pm 6.5\%$ 의 감소를 보였다.

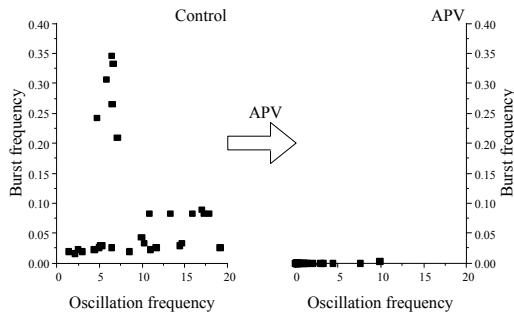


Fig. 2 Firing pattern changes after APV application.

3.3 Glutamate, GABA, dopamine agonist 가 STN 파형에 미치는 영향

14 개의 긴장성 전극부에 glutamate agonist 인 NMDA 를 처리한 경우 그 중 10 개의 전극부(71%)는 돌발성으로 그 패턴이 변하였고(Fig 3), 나머지 4 개 전극부는 활동전위 주파수가 $279.1 \pm 91.5\%$ 만큼 증가하였다. 돌발성 파형의 39 개 전극부는 NMDA 를 처리한 경우 그 주파수가 $135.6 \pm 26.3\%$ 만큼 증가하였다. GABA 를 처리한 경우 5 개의 긴장성 파형은 중요한 파형 변화를 일으키지 않았으나 (2.0 ± 0.7 Hz to 1.9 ± 1.5 Hz, $P > 0.05$) 돌발성 파형의 경우는 총 53 개의

전극부에서 $40.8 \pm 5.4\%$ 의 감소를 보였다. Dopamine 의 경우 34 개의 전극부는 긴장성 파형에서 의미있는 변화가 없었고(3.8 ± 0.6 Hz to 3.9 ± 0.5 Hz, $P > 0.05$) 25 개의 돌발성 전극부는 주파수가 $83.4 \pm 16.9\%$ 만큼 증가했다.

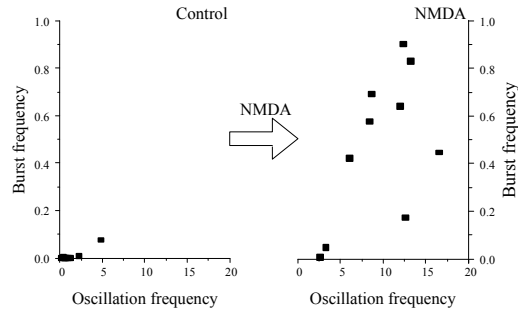


Fig. 3 Firing pattern changes after NMDA application.

4. 결론

본 연구는 시상밑핵이 동기성을 가진 돌발성 신호와 긴장성 신호를 보이며, glutamate 에 의해 패턴의 변화가 생기는 것을 통해 glutamatergic 연결성이 있음을 확인할 수 있었다. STN 에는 약 50%의 axon collateral 이 존재한다는 기존의 연구결과에 의해 패턴 변화가 STN 내부의 연결성인지, 기저핵 상의 연결성인지 알아보는 추가적 연구가 필요하다.

이 연구 결과는 STN 의 연결성 검증 후, 전기 자극을 통해 STN 의 어떠한 연결성에 변화가 생기는지를 알아볼 수 있으며 추후 뇌 심부 자극술 혹은 약물전달 시스템의 임상적용의 가능성을 보여준다.

Acknowledgement

본 연구는 기초기술연구회 NAP 협동연구사업 연구과제의 지원으로 수행되었다.

참고문헌

1. Kitai ST, Kita H. "Anatomy and physiology of the subthalamic nucleus: a driving force of the basal ganglia" The basal ganglia II: structure and function, pp357-373, 1987.
2. Nini A, Feingold A, Sloviter H, Bergman H, "Neurons in the globus pallidus do not show correlated activity in the normal monkey, but phase-locked oscillations appear in the MPTP model of parkinsonism" J Neurophysiol 74:1800-1805, 1995.