

정상망막과 변성망막에서 전압자극 파라미터 변화에 따른 망막신경절세포의 반응 비교

*충북대학교 의과대학 생리학교실, †연세대학교 보건과학대학 의공학과 신경공학연구소,
‡서울대학교병원 나노인공시각연구센터

예장희*[†] · 류상백^{†‡} · 김경환^{†‡} · 구용숙*[†]

색소성망막염(retinitis pigmentosa: RP)이나 연령관련 황반변성(age-related macular degeneration: AMD)과 같은 망막질환으로 인해 실명한 환자를 위해 인공시각장치가 개발되고 있다. 인공시각장치의 동작원리는 전기자극을 주어 신경세포의 활동도를 조절하는 것이므로 시각정보를 제대로 인코딩하기 위해 최적의 전기자극을 인가하는 것은 인공시각장치의 실용화를 위해 매우 중요한 요소이다. 그러므로 본 연구에서는 전압자극의 크기와 자극시간을 변화시켜 가면서 정상망막과 변성망막에 인가한 후 자극에 의해 유발된 망막신경절세포 반응을 분석하고 역치전하밀도를 비교함으로써 최적의 전기자극 조건을 찾아보고자 하였다. 이를 위하여 정상마우스와 *rd1* 마우스의 망막을 *in vitro* 상태로 분리한 후 망막의 신경절세포층이 전극을 향하여 부착되도록 한 후 망막신호를 기록하였다. *rd1* 마우스에서 얻은 변성망막의 망막신경절세포에서도 전압펄스를 인가시 정상망막의 망막신경절세포처럼 전압자극의 크기와 자극시간 변조에 대하여 반응하였다. 그러나 정상망막과 변성망막에서 망막신경절세포 반응의 시간적 패턴은 매우 달랐다: 정상망막의 망막신경절세포 반응은 전기자극 후 약 100 ms 내에서 1개의 피크만 나타나는 반면, 변성망막에서는 이보다 긴 400 ms 구간에서 약 10 Hz의 진동리듬을 가진 다수의 피크(~4개)들이 나타나는 것을 확인하였다. 또한 변성망막에서 망막신경절세포의 반응을 유발하기 위한 역치 전하밀도가 정상망막에서 보다 크게 상승하였다: 자극세기를 변화시켰을 때 정상망막의 역치 전하밀도는 $37.23 \sim 61.65 \mu\text{C}/\text{cm}^2$, *rd1* 마우스에서는 $70.50 \sim 99.87 \mu\text{C}/\text{cm}^2$ 로 2배가량 높은 것을 확인하였다. 자극시간을 변화시켰을 때 정상망막의 역치 전하밀도는 $22.69 \sim 37.57 \mu\text{C}/\text{cm}^2$, *rd1* 마우스에서는 $120.5 \sim 170.6 \mu\text{C}/\text{cm}^2$ 로 5배가량 높은 것을 확인하였다.

중심단어: 대인공시각장치, 최적의 전기자극 조건, 망막신경절세포, *rd1* 마우스, 역치 전하밀도

서 론

망막의 여러 질환 중 실명으로 이어지는 두 가지 주요질환인 색소성망막염(retinitis pigmentosa: RP)과 연령관련 황반변성(age-related macular degeneration: AMD)에서는 빛 신호를 신경세포의 활동전위로 변환해 주는 시세포(photoreceptor: rod and cone cell)의 변성이 초래되는 반면 상당수의 양극세포(bipolar cell)와 신경절세포는 비교적 오랜 기간 보존되어 있다.^{1,2)} 이와 같이 RP나 AMD에 의해 실명한 환

자들의 시각을 복원하기 위하여 유전자 치료법, 망막 이식법 등의 시도가 있었으나 상당수의 방법들에 한계가 있었다.^{3,4)}

RP 환자와 동일한 증상을 나타내는 여러 동물 모델 중에서 *rd1* 마우스(C3H/HeJ, *Pde6b^{rd1}*)가 가장 많이 연구되어 왔다. *rd1* 마우스는 막대세포(rod cell)에 존재하는 cGMP-phosphodiesterase (PDE)의 β -subunit의 결손으로 인하여 상염색체 열성으로 유전되는 RP 환자와 같은 양상의 시세포 손상을 보이고 있다.⁵⁾

인공시각장치(retinal prosthesis)는 변성된 망막에서 문제가 생긴 부분인 시세포의 역할 - 빛 자극을 전기신호로 변환해 주는 변환기(transducer) -을 대신하여 양극세포와 신경절세포 같은 생존해 있는 뉴런에 전기자극을 인가함으로써 고장난 시각 경로를 우회하여 남아있는 시각경로를 통한 전기신호 전달을 가능하게 하는 장치로 현재 실현가능성이 가장 높은 방법으로 평가받고 있으며 미국과 독일에

본 논문은 2008년도 충북대학교 학술연구지원사업의 연구비지원에 의하여 연구되었음.

이 논문은 2010년 4월 14일 접수하여 2010년 4월 26일 채택되었음.

책임저자 : 구용숙, (361-763) 충북 청주시 흥덕구 개신동 12번지

충북대학교 의과대학 생리학교실

Tel: 043)261-2870, Fax: 043)272-1603

E-mail: ysgoo@chungbuk.ac.kr

서 이미 임상시험에 성공하였다.^{6,8)}

인공시각장치가 성공적으로 개발되기 위해서는 여러 가지 문제점 - 즉 내측 망막세포층(양극세포층, 신경절세포층)의 생존력, 자극의 역치값(threshold)과 안전임계치(safety limit), 장치에 전달될 파워문제, 소재의 생체적합성 등등 - 들이 해결되어야 한다.⁹⁾ 지금까지 인공시각장치의 개발과 관련하여 전극의 개발, 전극의 포장방법, 또는 수술방법과 같은 하드웨어 쪽의 연구는 매우 활발히 진행되었다.¹⁰⁾ 그러나 전기자극을 이용하는 장치인 인공시각장치가 효과적으로 작동하기 위하여 ‘망막에 인가될 전기자극의 최적화’는 아주 중요한 전제조건임에도 불구하고 아직까지 변성망막에 인가될 최적화된 전기자극 조건이 명확히 결정되어지지 않은 상태이다.

전기자극 방법에는 크게 전압펄스를 인가하는 방법과 전류펄스를 인가하는 두 가지 방법이 있다. 전류자극은 실제로 조직에 인가되는 전하값을 바로 알 수 있으므로 그 편의성 때문에 일반적으로 많이 사용되고 있다. 그러나 전압자극은 실제 조직의 임피던스 값이 어떤 값을 가지던 상관없이 최종적으로 인가되는 전압치가 결정되므로 좀더 안전하다는 장점이 있다.

즉 인공시각장치를 통해 망막에 인가되는 전기자극의 조건은 안전성을 고려할 때 최소한의 전류 또는 전하량으로 시각을 유발하여야 바람직하다. 즉 안전임계치의 결정이 아주 중요한 데 전기자극을 위한 안전임계치는 전극과 조직 계면(electrode-tissue interface)에서 발생하는 전기화학반응(electrochemical reaction)에 의해 결정된다.¹¹⁾ 전기화학반응은 과도한 포텐셜이 걸릴 때 일어나며 낮은 포텐셜하에서는 전류는 안전하게 흐를 수 있다. 전압자극을 사용하게 되면 과도한 포텐셜을 피할 수 있게 되며 이점이야말로 전압자극이 전류자극과 비교했을 때 가지게 되는 장점이다.¹²⁾

지금까지 *rd1* 마우스의 변성망막에서 진행된 몇 안되는 전기자극 실험¹³⁻¹⁵⁾에서도 전류자극을 사용하였으며 전압자극 파라미터를 변화시키면서 망막신경절세포의 반응 변화를 본 연구결과는 전무하며, 더욱이 다채널전극을 사용하여 망막신경망 전체의 반응을 기록하며 전압자극 파라미터를 변조한 연구는 본 연구가 처음이다.

그러므로 본 연구에서는 전압자극의 크기와 자극시간을 변화시켜 가면서 정상망막과 변성망막에 인가한 후 자극에 의해 유발된 망막신경절세포 반응을 분석하고 역치전하밀도를 비교함으로써 최적의 전기자극 조건을 찾아보고자 하였다. 그리고 이렇게 찾은 최적의 역치전하밀도는 본 연구

자가 소속되어 있는 나노인공시각개발센터에서 현재 추진하고 있는 한국형 인공망막장치 개발과 연계하여 이 장치에 인가될 자극을 결정함에 있어 가이드라인으로 사용될 것이다.

재료 및 방법

1. 망막신경절세포의 전기신호 기록

생후 8주령(P-56)의 정상망막 모델 마우스(C57BL/6J, n=3)와 망막변성모델인 *rd1* 마우스(C3H/HeJ, n=3)의 망막절편을 이용하여 실험을 수행하였으며, 충북대학교 자체 동물실험 규정(CBNURA-042-0902-1)을 준수하였다. 망막신경절세포의 신호를 기록하기 위하여 Stett 등이 이용한 방법¹⁶⁾을 사용하여 1) 마우스의 안구를 적출하고, 2) 마이크로 포셉을 이용하여 망막을 조심스럽게 분리한 후, 3) 3×3 mm 크기로 망막절편을 만들었다. 전기신호 기록실험은 망막절편에 인공뇌척수액(artificial cerebrospinal fluid (ACSF) solution (124 mM NaCl, 10 mM Glucose, 1.15 mM KH₂PO₄, 25 mM NaHCO₃, 1.15 mM MgSO₄, 2.5 mM CaCl₂, 5 mM KCl, bubbled with 95% O₂, 5% CO₂, pH: 7.3~7.4, 32°C)을 관류시키면서 수행하였다.

2. 데이터 기록 시스템과 다채널 전극

MEA 60 시스템(Multi Channel Systems GmbH, Germany)은 다채널전극(multi-electrode array: MEA), 자극기(STG 1004), 증폭기(MEA 1060), 온도 제어유닛, 데이터 기록용 하드웨어(Mc_Card)와 소프트웨어(Mc_Rack)로 구성되어 있다. 다채널전극은 전극직경 30 μm, 전극간 거리 200 μm의 8행 8열로 배열된 평판형 전극이다. 또한 전극의 표면은 다공성 TiN으로 코팅되어 낮은 임피던스를 갖고 있으며, 네 개의 모서리는 아날로그 신호를 기록하기 위하여 전극이 없는 빈 공간으로 되어 있다. 망막 전기신호는 60개의 전극을 이용하여 대역폭 10~3,000 Hz, 1,200배 증폭, 채널당 25 kHz의 샘플링 주기로 기록하였다.

3. 전기자극

전기자극을 인가하기 전 아무 자극이 없을 때 망막신경절세포의 자발적인 흥분과(spontaneous activity)를 5분간 기록하여 컨트롤 데이터로 사용하였다. 60개의 채널 중 가운데 위치한 임의의 한 채널에 전기자극을 인가하였으며, 15번 채널은 접지용으로 사용하였고, 나머지 58개의 전극은 기록전극으로 사용하였다. 인가한 전기자극은 전하량이 균

형을 이룬 전압자극(charge balanced biphasic voltage pulse)으로 양극성 펄스가 먼저 인가(anodic phase first)되도록 디자인 하였다. 망막의 역치자극을 알아보기 위하여 1) 전압 세기를 1.5 V로 고정하고 자극시간을 100, 200, 300, 500, 1,000 μ s로 변화시킨 자극 2) 자극 시간을 500 μ s로 고정하고 전압 세기를 0.1, 0.3, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0 V로 변화시킨 자극을 각 phase당 50번씩 반복하여 인가하였다.

4. 데이터 분석

기록된 데이터는 스파이크 분석 프로그램인 Offline Sorter™ (Plexon Inc, Dallas, TX, USA)를 사용하여 무작위로 섞여있는 수많은 망막신경절세포 흥분파를 개개의 신경절세포 유닛으로 분리하였다. 이렇게 분리된 스파이크를 상용 프로그램 Neuroexplorer™ (Plexon Inc, Dallas, TX, USA)에서 제공하는 분석 툴인 자극 후 히스토그램(Post-stimulus time histogram: PSTH), raster plot 등을 이용하여 전기자극에 의해 유발된 망막신경절세포의 반응을 확인하였다.

자극이 인가되지 않을 때에도 망막신경절세포는 자발적으로 스파이크를 발사하므로 전기자극에 의해 유발된 반응은 다음과 같이 정의하였다. 정상망막에서는 자극 시점을 기준으로 자극 후 200 ms 동안 나타난 스파이크 수가 자극 전 200 ms 구간 동안의 스파이크 수의 300%가 넘는 경우 반응으로 정의하였으며, 자극 후 스파이크 수와 자극 전 스파이크 수의 차이를 전기자극에 의해 유발된 스파이크 수로 카운트하였다. *rdl* 마우스는 정상에 비해 자발적 스파이크 수가 훨씬 많이 발사되며 주기적으로 진동하는 리듬이 관찰되는 까닭에 정상망막보다 상대적으로 긴 구간인 400 ms 동안의 변화를 비교하였다. 즉 자극 후 400 ms 동안 나타난 스파이크 수가 자극 전 400 ms 구간의 스파이크 수에 비해 130%가 넘는 경우 반응으로 정의하였으며, 정상망막에서와 같이 자극 후 스파이크 수와 자극 전 스파이크 수의 차이를 전기자극에 의해 유발된 스파이크 수로 카운트하였다. 자극시간과 자극세기를 변화시키면서 망막에 인가하였으므로 자극시간 또는 자극 세기에 따른 망막신경절세포의 반응 커브를 구할 수 있었다. 망막신경절세포의 반응 커브는 볼츠만 식을 이용한 S자형 커브(sigmoidal curve)를 이용하여 커브피팅을 하였으며, 50번의 반복자극에 의해 유발된 스파이크 수가 0.5일 때의 값을 각각 역치 자극시간과 역치 자극세기로 정의하였다.

5. 임피던스 측정

전압자극 인가 시 전극의 정확한 임피던스를 알아보기

위하여 전극 자체의 임피던스와 입력 임피던스를 electrochemical workstation인 Im6e (ZAHNER-Electrik GmbH & CoKG, Kronach, Germany)를 이용하여 측정하였다. 1 kHz, 5 mV를 200번 반복하여 측정한 결과 인공뇌척수액 하에서의 전극 임피던스는 평균 $256.3 \pm 59.79 \text{ k}\Omega$ ($n=10$ channels) 이었고, 망막이 부착된 경우 입력 임피던스는 정상망막에서는 $487.78 \pm 120.45 \text{ k}\Omega$ ($n=3, 18$ channels), *rdl* 마우스에서는 $470.94 \pm 81.19 \text{ k}\Omega$ ($n=3, 18$ channels)으로 측정되었으나 정상망막과 변성망막 사이에 유의한 차이는 없었다($p > 0.05$).

6. 전하밀도 계산

입력 임피던스 측정값을 사용하여 다음과 같이 전하밀도 역치를 계산하였다.

$$I = \frac{V}{Z} \quad (1)$$

“*I*”는 계산된 전류, “*V*”는 커브피팅을 통해 얻은 역치 전압세기, “*Z*”는 측정된 입력 임피던스이다.

$$Q = I \cdot T \quad (2)$$

“*Q*”는 전하량, “*T*”는 커브피팅을 통해 얻은 역치자극 시간을 뜻한다.

전하밀도(*D*)는 3번 식을 이용하여 구하였다.

$$D = \frac{Q}{\pi r^2} \quad (3)$$

“*Q*”는 계산된 전하밀도이며 “*r*”은 전극의 반경값($15 \mu\text{m}$)이다.

결 과

1. 정상망막과 변성망막에서 신경절세포 파형과 전압자극에 의해 유발된 신경절세포 반응 특성 비교

정상 마우스와 *rdl* 마우스 각각 3마리에서 마리당 1개의 망막 패치를 얻어 총 3개의 망막 패치를 사용하여 실험하였으며, 이들 각 3개의 패치 중 2개는 전기자극에 반응을 나타내지 않았으므로 나머지 1개 패치에서 얻은 데이터를 이용하여 분석하였다. 정상망막에서는 자발적인 반응을 보인 총 18개의 망막신경절 세포들 중 13개의 신경절세포가 전기자극에 반응을 보였으며, 이들 13개의 신경절세포 중

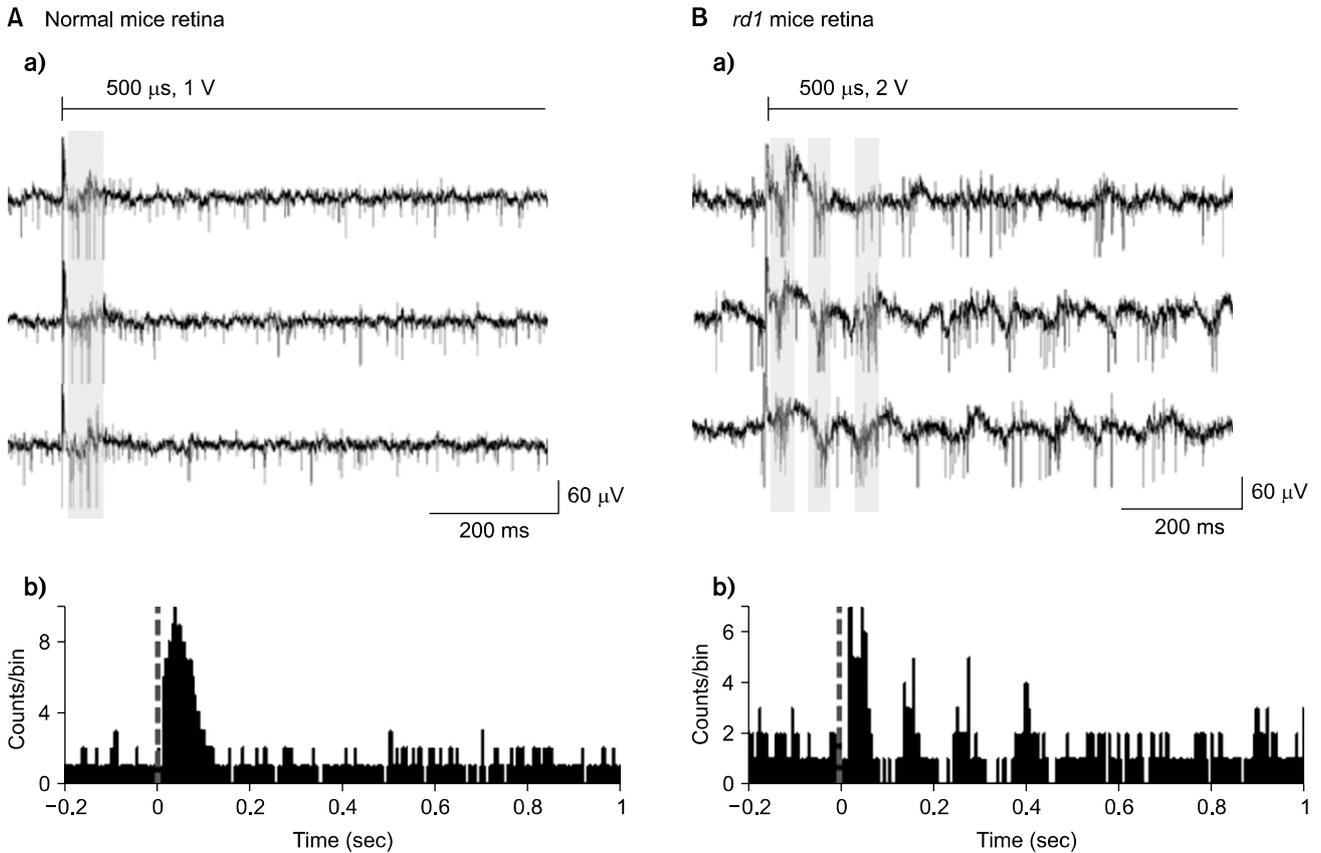


Fig. 1. The response of electrically-evoked RGC spikes in normal and *rd1* mice retinas. (A) In normal mice retina. (a) Typical waveforms show that only few spikes are evoked with electrical stimulation. The voltage stimulus consists of biphasic pulse (anodal phase first, phase duration $500\ \mu\text{s}$ with no inter-phase delay, $1\ \text{V}$ amplitude). (b) PSTH shows single peak with the latency of less than $100\ \text{ms}$. (B) In *rd1* mice retina. (a) Typical waveforms show that $\sim 10\ \text{Hz}$ background oscillatory rhythm and rhythmic bursting type firing of RGC spikes (marked by grey zone). Biphasic voltage stimulus with the amplitude of $2\ \text{V}$ is applied. (b) PSTH shows multiple (~ 4) peaks with $\sim 10\ \text{Hz}$ rhythm within $400\ \text{ms}$.

에서 전기 자극세기가 증가함에 따라 신경절세포의 반응이 선형적으로 증가하는 경우가 6개이었고 전기 자극시간이 증가함에 따라 신경절세포의 반응이 선형적으로 증가하는 경우가 8개이었다. 변성망막에서는 자발적인 반응을 보인 총 22개의 신경절세포들 중 14개의 세포가 전기자극에 반응을 보였으며, 이들 중 5개와 7개의 세포가 전기자극 세기와 자극시간 증가에 따라 선형적으로 증가하는 반응을 보였다. 전기자극에 의해 유발된 반응과형은 정상망막에서는 단 몇 개의 신경절세포 스파이크만 나타난 반면, *rd1* 마우스 망막에서는 진동리듬을 보이는 스파이크가 나타났다. 정상망막과 *rd1* 마우스 망막에서 PSTH를 통해 확인한 전기자극에 의해 유발된 신경절세포 반응은 매우 달랐다. 정상망막에서는 전기자극 후 약 $100\ \text{ms}$ 이내에서 한 개의 피크가 나타나는 반면, *rd1* 마우스에서는 약 $10\ \text{Hz}$ 의 주기로

여러 개(~ 4 개)의 피크들이 약 $400\ \text{ms}$ 이내에서 나타났다. 그러나 자극 후 나타난 첫 번째 피크는 $100\ \text{ms}$ 이내에서 관찰되었다(Fig. 1).

2. 정상망막에서 전압자극에 의해 유발된 망막신경절세포의 반응

1) 자극세기를 변화시켰을 때 망막신경절세포의 반응변화: 자극시간을 $500\ \mu\text{s}$ 로 고정하고 자극세기를 $0.3\sim 3.0\ \text{V}$ 로 변화시키면서 정상망막에 인가한 결과 자극세기가 증가함에 따라 선형적으로 증가하는 반응을 보이는 신경절세포가 총 8개이었고, $0.5\ \text{V}$ 의 자극부터 명확한 망막신경절세포 반응을 확인하였다. 자극세기가 $1.0\sim 3.0\ \text{V}$ 로 증가했을 때 망막신경절세포의 반응은 $1.0\ \text{V}$ 에 비해 다소 감소하였다. S자형 커브피팅을 이용하여 자극세기 vs 망막신경절세

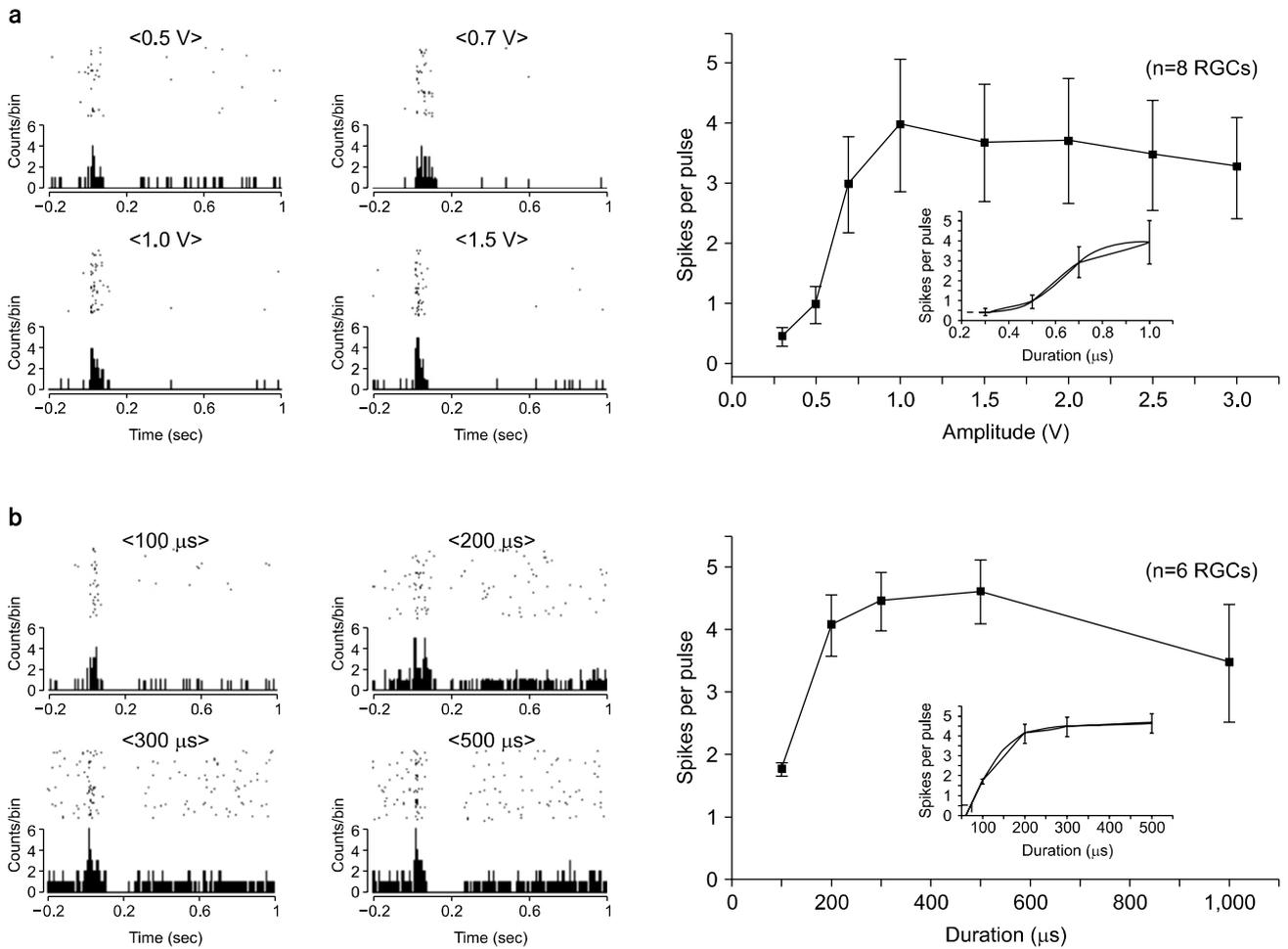


Fig. 2. Electrically-evoked RGC responses to different voltage amplitudes (a) and voltage durations (b) in normal mice retinas. (a) Left: Upper and lower traces show raster plots and PSTH with different voltage amplitudes of 0.5 V, 0.7 V, 1.0 V, and 1.5 V (while voltage duration is fixed with 500 μ s). Right: RGC response vs. voltage amplitude curve. Red line is sigmoidal fits to data. When the number of evoked RGC spikes per pulse is 0.5, threshold amplitude is extracted from the fitted line (0.32 V). (b) Left: Raster plots and PSTHs with different voltage durations of 100 μ s, 200 μ s, 300 μ s, and 500 μ s (while voltage amplitude is fixed with 1.5 V). Right: RGC response vs. voltage duration curve. By sigmoidal fits to data, threshold duration is extracted as 65 μ s.

포 반응 커브를 구한 결과, 역치 자극세기는 0.32 V임을 확인하였다(Fig. 2a).

2) 자극시간을 변화시켰을 때 망막신경절세포의 반응변화: 자극세기를 1.5 V로 고정하고 자극시간을 100~1,000 μ s로 변화시키면서 정상망막에 인가한 결과 총 6개의 망막신경절세포에서 반응을 확인하였으며, 100 μ s의 자극시간부터 명확한 신경절세포 반응을 확인하였다. 자극시간 500 μ s에서 최대 반응을 나타냈으며, 500 μ s 초과 시 망막신경절세포의 반응이 감소하였다. S자형 커브피팅을 이용하여 자극시간 vs 망막신경절세포 반응 커브를 구한 결과, 역치 자극시간은 65 μ s임을 확인하였다(Fig. 2b).

3. rd1 마우스 망막에서 전압자극에 의해 유발된 망막신경절세포의 반응

1) 자극세기를 변화시켰을 때 망막신경절세포의 반응변화: 자극시간을 500 μ s로 고정하고 자극세기를 0.3~3.0 V로 변화시키면서 변성망막에 인가한 결과 총 7개의 망막신경절세포에서 반응을 확인할 수 있었다. 0.7 V의 자극부터 명확한 망막신경절세포의 반응을 확인하였으며 자극세기가 3.0 V일 때 망막신경절세포가 최대로 반응하는 것을 확인하였다. S자형 커브피팅을 이용하여 자극세기 vs 망막신경절세포 반응 커브를 구한 결과, 역치 자극세기는 0.55 V

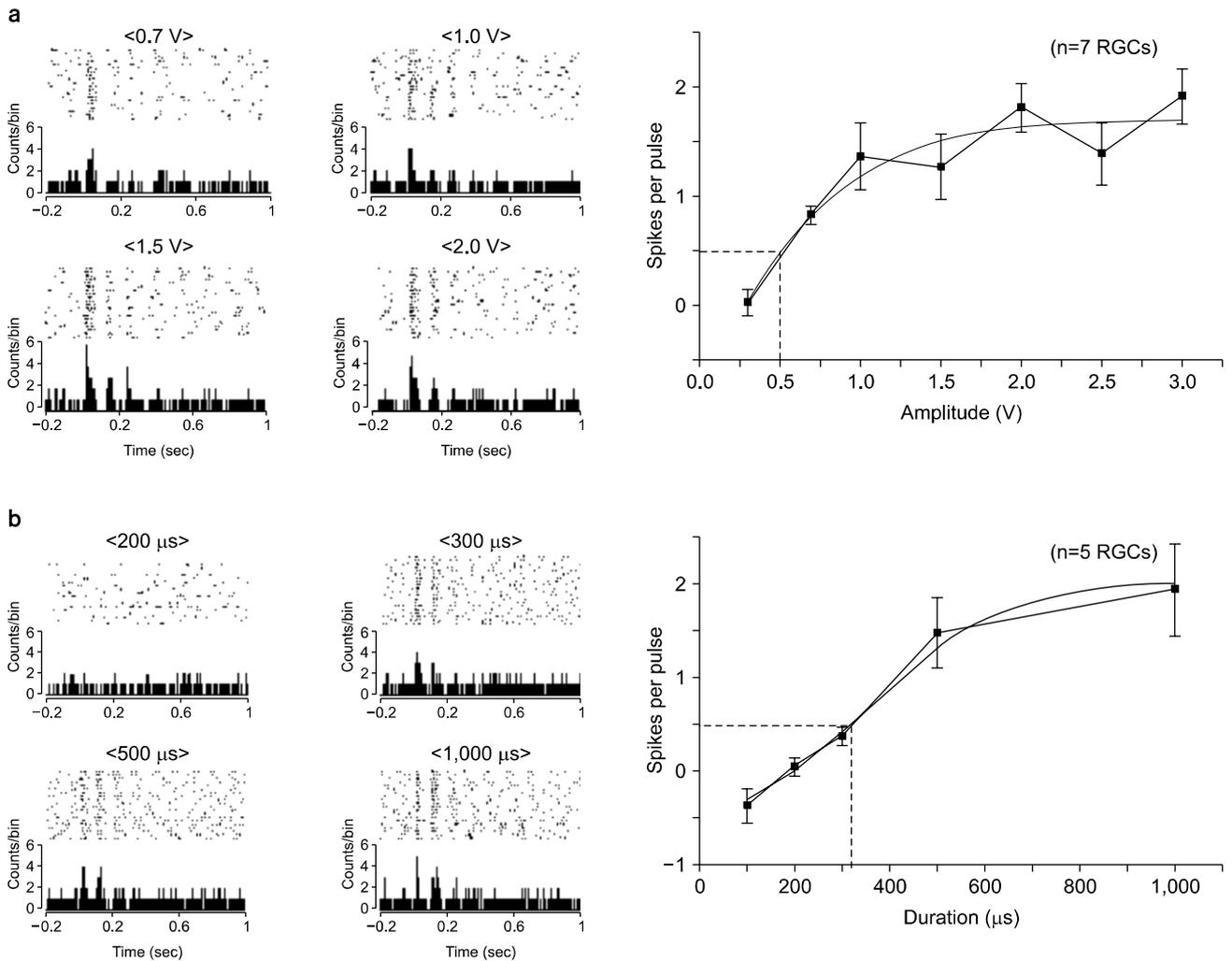


Fig. 3. Electrically-evoked RGC responses to different voltage amplitudes (a) and voltage durations (b) in *rd1* mice retinas. (a) Left: Raster plots and PSTH with different voltage amplitudes of 0.7 V, 1.0 V, 1.5 V, and 2.0 V (while voltage duration is fixed with 500 μs). Right: RGC response vs. voltage amplitude curve. (a) By sigmoidal fits to data, threshold amplitude is extracted as 0.55 V. (b) Left: Raster plots and PSTHs with different voltage durations of 200 μs , 300 μs , 500 μs , and 1,000 μs (while voltage amplitude is fixed with 1.5 V). Right: RGC response vs. voltage duration curve. (a) By sigmoidal fits to data, threshold duration is extracted as 313.25 μs .

임을 확인하였다(Fig. 3a).

2) 자극시간을 변화시켰을 때 망막신경절세포의 반응변화: 자극세기를 1.5 V로 고정하고 자극시간을 100~1,000 μs 로 변화시키면서 변성망막에 인가한 결과 총 5개의 망막신경절세포 반응을 확인하였다. 300 μs 의 자극시간부터 약 10 Hz 리듬을 보이는 망막신경절세포 스파이크의 피크를 확인할 수 있었다. 최대 반응은 1,000 μs 에서 확인되었다. S 자형 커브피팅을 이용하여 자극시간 vs 망막신경절세포 반응 커브를 구한 결과, 역치 자극시간은 313.25 μs 임을 확인하였다(Fig. 3b).

4. 정상망막과 *rd1* 마우스 망막의 역치 전하밀도 계산

입력 임피던스 측정 후 실험방법에서 서술한 1~3의 수식을 이용하여 역치 전하밀도를 계산하였다. 정상망막에서 측정된 입력 임피던스는 367.33~608.23 $\text{k}\Omega$ 으로 이를 전류값으로 환산하면 2.47~4.08 μA 에 해당된다. 1.5 V로 자극세기를 고정하고 자극시간을 변화시킨 실험에서 역치 자극시간이 65 μs 이므로 이에 해당하는 역치 전하밀도는 22.69~37.57 $\mu\text{C}/\text{cm}^2$ 이다. 자극시간을 500 μs 로 고정하고 자극세기를 변화시킨 실험에서 역치 자극세기는 0.32 V로 역치전

Table 1. The threshold charge densities of retinal ganglion cells (RGCs) in normal and *rd1* mice retina.

Voltage stimulus condition	Threshold charge density in normal mice retina	Threshold charge density in <i>rd1</i> mice retina
When voltage duration is changed (with fixed voltage amplitude: 1.5 V)	22.69~37.57 $\mu\text{C}/\text{cm}^2$ (n=6)	120.50~170.60 $\mu\text{C}/\text{cm}^2$ (n=5)
When voltage amplitude is changed (with fixed voltage duration: 500 μS)	37.23~61.65 $\mu\text{C}/\text{cm}^2$ (n=8)	70.50~99.87 $\mu\text{C}/\text{cm}^2$ (n=7)

하밀도는 37.23~61.65 $\mu\text{C}/\text{cm}^2$ 임을 확인하였다.

rd1 마우스에서 측정된 입력 임피던스는 389.76~552.13 $\text{k}\Omega$ 으로 이를 전류값으로 환산하면 2.72~3.85 μA 에 해당된다. 1.5 V로 자극세기를 고정하고 자극시간을 변화시킨 실험에서 역치 자극시간이 313.25 μs 이므로 이에 해당하는 역치 전하밀도는 120.5~170.6 $\mu\text{C}/\text{cm}^2$ 이다. 자극시간을 500 μs 로 고정하고 자극세기를 변화시킨 실험에서 역치 자극세기는 0.55 V로 역치 전하밀도는 70.50~99.87 $\mu\text{C}/\text{cm}^2$ 임을 확인하였다. 역치 전하밀도는 Table 1에 정리하였다.

고찰 및 결론

실험을 통해 변성된 망막에서도 정상망막에서처럼 전기 자극을 인가하여 망막신경절세포의 반응이 유발되며 또한 그 반응을 조절할 수 있음을 확인하였다. 그러나 PSTH를 통해 확인한 정상망막과 *rd1* 마우스의 반응패턴은 확연히 달랐다. 정상망막의 망막신경절세포 반응은 전기자극 후 약 100 ms 내에서 1개의 피크만 나타나는 반면, *rd1* 마우스에서는 이보다 긴 400 ms 구간에서 약 10 Hz의 진동리듬을 가진 다수의 피크(~4개)들이 나타나는 것을 확인하였다. 또 다른 중요한 결과는 *rd1* 마우스에서 망막신경절세포의 반응을 유발하기 위한 역치 전하밀도가 정상망막에서 보다 크게 상승한 것이다. 자극세기를 변화시켰을 때 정상망막의 역치 전하밀도는 37.23~61.65 $\mu\text{C}/\text{cm}^2$, *rd1* 마우스에서는 70.50~99.87 $\mu\text{C}/\text{cm}^2$ 로 2배가량 높은 것을 확인하였다. 자극시간을 변화시켰을 때 정상망막의 역치 전하밀도는 22.69~37.57 $\mu\text{C}/\text{cm}^2$, *rd1* 마우스에서는 120.5~170.6 $\mu\text{C}/\text{cm}^2$ 로 5배가량 높은 것을 확인하였다.

1. *rd1* 마우스에서 기록된 비정상적인 10 Hz 주기의 진동리듬

정상망막에서 기록된 파형과 달리 *rd1* 마우스 망막파형의 가장 주된 특징은 8~10 Hz 주기로 나타나는 진동리듬이다. 이 진동리듬은 망막신경절세포의 자발적인 흥분과

뿐만 아니라 field potential (slow wave component)에서도 관찰된다.¹⁷⁻²⁰ 현재까지 변성망막을 이용한 전기자극 실험 결과¹³⁻¹⁵는 아주 소수만 보고되고 있을 뿐 아니라 약 10 Hz 주기로 나타나는 비정상적인 리듬에 대한 언급은 거의 없는 상태이다. O'Hearn 등은 직경 125 μm 의 한 쌍의 백금전극(하나의 전극은 전류소스로 다른 전극은 전류싱크로 사용)을 사용하여 망막 상부 또는 망막 하부에 자극을 인가하여 8~12주령의 정상 마우스와 *rd1* 마우스의 망막신경절세포의 역치를 측정하였다.¹³ 필터 대역폭은 300~3,000 Hz로 설정하였으며, 아주 짧은 시간인 12 ms 이내의 시간대에서 전기자극에 의해 유발된 신경절세포의 반응을 기록하였다. O'Hearn 등이 기록한 망막신경절세포의 반응은 대부분 전기자극 후 2~3 ms 이내에 나타나는 짧은 반응이다. 그러나 본 연구에서 관찰한 망막신경절세포의 반응은 시냅스 네트워크를 통해 전달된 간접적인 반응으로 해석된다. 만일 O'Hearn 등이 보다 긴 시간동안 전기자극에 의해 유발된 망막신경절세포의 반응을 관찰하였다면 본 연구자가 관찰한 약 10 Hz 주기의 진동리듬을 발견했을 것으로 예측된다.

Jensen과 Rizzo는 직경 400 μm 의 전극 한 개를 이용하여 망막하부에서 자극하고 직경 200 μm 백금/텅스텐 전극 한 개를 기록전극으로 사용하여 기록한 망막신경절세포의 반응을 Type I, II, III로 분류하였다.¹⁴ Type I 세포는 전기자극 후 20 ms 이내에 단일 스파이크 burst가 나타나는 세포로 정상망막에서는 평균 7~18 ms, *rd1* 마우스에서는 평균 7~20 ms로 나타난다. Type II 세포는 전기자극 후 37 ms 이상의 긴 잠복기를 가진 단일 스파이크 burst가 나타나는 세포로 정상망막에서는 평균 44~135 ms, *rd1* 마우스에서는 평균 38~90 ms ($p < 0.001$)로 나타난다. Type III 세포는 2~3개의 스파이크 burst를 나타내는 세포로 첫 번째와 두 번째 피크의 잠복기는 정상망막에서 각각 7~14 ms, 45~140 ms 그리고 *rd1* 마우스에서는 각각 7~10 ms, 36~130 ms로 확인되었다. Jensen & Rizzo의 연구에서는 망막신경절세포의 스파이크를 기록하기 위해 100~5,000 Hz의 band

pass 필터를 이용하였기 때문에 본 연구진이 기록했던 약 10 Hz의 진동리듬을 확인할 수 없었을 것으로 해석된다.

2) *rd1* 마우스의 높은 역치 전하밀도

본 연구를 통해 전압자극의 자극세기를 변화시켰을 때 정상망막의 역치 전하밀도는 $37.23 \sim 61.65 \mu\text{C}/\text{cm}^2$, *rd1* 마우스에서는 $70.50 \sim 99.87 \mu\text{C}/\text{cm}^2$ 로 2배, 자극시간을 변화시켰을 때는 정상망막에서 역치 전하밀도는 $22.69 \sim 37.57 \mu\text{C}/\text{cm}^2$, *rd1* 마우스에서는 $120.5 \sim 170.6 \mu\text{C}/\text{cm}^2$ 로 약 5배가량 높은 것을 확인하였다.

Jensen과 Rizzo의 연구에서 정상망막의 OFF, ON 신경절세포의 역치 전하밀도는 각각 $39.8, 42.2 \mu\text{C}/\text{cm}^2$ 이었고, *rd1* 마우스에서는 이보다 약 9~10배 가량 높은 $398.1 \mu\text{C}/\text{cm}^2$ 로 보고되었다.¹⁵⁾ 본 연구에서는 정상망막의 ON 또는 OFF 신경절세포의 반응을 따로 구분하지는 않았지만 Jensen과 Rizzo의 연구와 동일한 약 $40 \mu\text{C}/\text{cm}^2$ 수준의 역치 전하밀도 값을 확인하였으며, *rd1* 마우스의 역치 전하밀도 값도와 유사한 수준임을 확인하였다. Jensen과 Rizzo의 연구에서 사용한 자극전극과 기록전극 셋업과 본 연구진이 사용한 셋업의 차이를 감안할 경우 유의한 수준이다.

rd1 마우스에서 관찰되는 높은 역치 전하밀도의 원인으로 다음과 같은 가능성을 생각할 수 있다. 첫째, 시세포의 소실로 양극세포로 전달되는 흥분성 입력신호가 사라졌거나¹⁷⁾ 또는 양극세포 자체의 구조적인 변성²¹⁾때문에 흥분성 입력신호를 양극세포에서 망막신경절세포로 전달하기 위해 정상망막에서보다 더 큰 저분극이 필요한 것으로 해석된다. 둘째, *rd1* 마우스에서 나타난 역치 전하밀도의 상승은 시세포의 손실과 시세포 손실에 의해 수반된 망막 신경망의 재구성에 의한 것으로 예상된다.²²⁾ 그러나 본 실험에서 사용한 *rd1* 마우스는 생후 8주령(P-56)으로 양극세포와 아마크린 세포 등이 위치한 망막내층(inner retina)의 광범위한 재구성은 크게 진행되지 않은 상태이다. Margolis 등은 *rd1* 마우스의 망막내층이 생후 226일까지도 잘 보존되어 있다고 보고한 바 있다.¹⁹⁾ 셋째로 *rd1* 마우스에서 망막변성에 의해 남아있는 개개의 망막신경절세포의 흥분하는 정도가 정상망막에 비하여 현저히 감소하였을 가능성을 생각할 수 있다.

참 고 문 헌

- Humayun MS, de Juan Jr E, Baron Y, et al: Morphometric analysis of the extramacular retina from postmortem eyes with

- retinitis pigmentosa. Invest Ophthalmol Vis Sci 40:143-148 (1999)
- Medeiros NE, Curcio CA: Preservation of ganglion cell layer neurons in age-related macular degeneration. Invest Ophthalmol Vis Sci 42:795-803 (2001)
- Acland GM, Aguirre GD, Ray J, et al: Gene therapy restores vision in a canine model of childhood blindness. Nature Genetics 28:92-95 (2001)
- del Cerro M, Gash DM, Rao GN, et al: Retinal transplants into the anterior chamber of the rat eye. Neurosci 21: 707-723 (1987)
- Farber DB, Flannery JG, Bowes-Rickman C: The rd mouse story: seventy years of research on an animal model of inherited retinal degeneration. Prog Ret Eye Res 13:31-64 (1994)
- Humayun MS, Weiland JD, Fujii GY, et al: Visual perception in a blind subject with a chronic microelectronic retinal prosthesis. Vis Res 43:2573-2581 (2003)
- Rizzo III JF, Wyatt J, Lowenstein J, et al: Perceptual efficacy of electrical stimulation of human retina with a micro-electrode array during short-term surgical trials. Invest Ophthalmol Vis Sci 44:5362-5369 (2003)
- Bethge P, Traufetter G: Digital encounter. Der Spiegel 52: 126-128 (2009)
- Lowenstein JI, Montezuma SR, Rizzo III JF: Outer retinal degeneration: An electronic retinal prosthesis as a treatment strategy. Archives of Ophthalmology 122:588-596 (2004)
- Tombran-Tink J, Barnstable CJ, Rizzo JF III: Visual prosthesis and ophthalmic devices: new hope in sight. Humana Press, New Jersey (2007), pp. 71-94
- Cogan SF: Neural stimulation and recording electrodes. Ann Rev Biomed Eng 10:275-309 (2008)
- Cantrell DR, Troy JB: Extracellular stimulation of mouse retinal ganglion cells with non-rectangular voltage-controlled waveforms. Conference Proceeding IEEE. Engineering in Medicine and Biology Society. Hilton Minneapolis, 2009, Minnesota, USA, pp. 642-645
- O'Hearn TM, Sadda SR, Weiland JD, Maia M, Margalit E, Humayun MS: Electrical stimulation in normal and retinal degeneration (rd1) isolated mouse retina. Vis Res 46:3198-3204 (2006)
- Jensen RJ, Rizzo JF: Activation of retinal ganglion cells in wild-type and rd1 mice through electrical stimulation of the retinal neural network. Vis Res 48:1562-1568 (2008)
- Jensen RJ, Rizzo III JF: Activation of ganglion cells in wild-type and rd1 mouse retinas with monophasic and biphasic current pulses. J Neural Eng 6:1-7 (2009)
- Stett A, Barth A, Weiss S, Haemmerle H, Zrenner E: Electrical multisite stimulation of isolated chicken retina. Vis Res 40:1785-1795 (2000)
- Ye JH, Goo YS: The slow wave component of retinal activity in rd/rd mouse recorded with a multi-electrode array. Physiol Measurement 28:1079-1088 (2007)
- Stasheff SF: Emergence of sustained spontaneous hyperactivity and temporary preservation of OFF responses in ganglion cells of the retinal degeneration (*rd1*) mouse. J Neurophysiol 99:1408-1421 (2008)

19. Margolis DJ, Newkirk G, Euler T, Detwiler PB: Functional stability of retinal ganglion cells after degeneration-induced changes in synaptic input. *J Neurosci* 28:6526-6536 (2008)
20. Ryu SB, Ye JH, Lee JS, Goo YS, Kim CH, Kim KH: Electrically-evoked Neural Activities of rd1 Mice Retinal Ganglion Cells by Repetitive Pulse Stimulation. *Korean J Physiol Pharmacol* 13:443-448 (2009)
21. Strettoi E, Porciatti V, Falsini B, Pignatelli V, Rossi C: Morphological and functional abnormalities in the inner retina of the rd/rd mouse. *J Neurosci* 22:5492-5504 (2002)
22. Jones BW, Marc RE: Retinal remodeling during retinal degeneration. *Exp Eye Res* 81:123-137 (2005)

Comparison of Retinal Ganglion Cell Responses to Different Voltage Stimulation Parameters in Normal and *rd1* Mouse Retina

Jang Hee Ye^{*†}, Sang Baek Ryu^{†‡}, Kyung Hwan Kim^{†‡}, Yong Sook Goo^{*†}

^{*}Department of Physiology, Chungbuk National University School of Medicine, Cheongju,

[†]Department of Biomedical Engineering, College of Health Science, Yonsei University, Wonju,

[‡]Nano Artificial Vision Research Center, Seoul National University Hospital, Seoul, Korea

Retinal prostheses are being developed to restore vision for the blind with retinal diseases such as retinitis pigmentosa (RP) or age-related macular degeneration (AMD). Since retinal prostheses depend upon electrical stimulation to control neural activity, optimal stimulation parameters for successful encoding of visual information are one of the most important requirements to enable visual perception. Therefore, in this paper, we focused on retinal ganglion cell (RGC) responses to different voltage stimulation parameters and compared threshold charge densities in normal and *rd1* mice. For this purpose, we used *in vitro* preparation for the retina of normal and *rd1* mice on micro-electrode arrays. When the neural network of *rd1* mouse retinas is stimulated with voltage-controlled pulses, RGCs in degenerated retina also respond to voltage amplitude or voltage duration modulation as well in wild-type RGCs. But the temporal pattern of RGCs response is very different; in wild-type RGCs, single peak within 100 ms appears while in RGCs in degenerated retina multiple peaks (~4 peaks) with ~10 Hz rhythm within 400 ms appear. The thresholds for electrical activation of RGCs are overall more elevated in *rd1* mouse retinas compared to wild-type mouse retinas: The thresholds for activation of RGCs in *rd1* mouse retinas were on average two times higher ($70.50 \sim 99.87 \mu\text{C}/\text{cm}^2$ vs. $37.23 \sim 61.65 \mu\text{C}/\text{cm}^2$) in the experiment of voltage amplitude modulation and five times higher ($120.5 \sim 170.6 \mu\text{C}/\text{cm}^2$ vs. $22.69 \sim 37.57 \mu\text{C}/\text{cm}^2$) in the experiment of voltage duration modulation than those in wild-type mouse retinas. This is compatible with the findings from human studies that the currents required for evoking visual percepts in RP patients is much higher than those needed in healthy individuals. These results will be used as a guideline for optimal stimulation parameters for upcoming Korean-type retinal prosthesis.

Key Words: Retinal prosthesis, Optimal stimulation parameter, Retinal ganglion cell, *rd1* mice, Threshold charge density