

## 다채널전극으로 기록한 토끼 망막신경절세포의 활동전위 파형 구분

충북대학교 의과대학 \*의공학교실,†생리학교실

진 계 환\* · 이 태 수\* · 구 용 숙†

망막에서 나오는 활동전위와 같이 복잡한 신경망을 거쳐 처리되는 전기신호를 분석하기 위해서는 기존의 단일 전극 기록법으로는 어렵다. 단일 전극을 통한 활동전위의 기록은 개개의 신경세포 특성을 알아내는 데에는 유용한 방법이나 신경세포 간의 시간적, 공간적인 관계는 알아낼 수 없다는 한계를 가지고 있으므로 이같은 한계를 극복하기 위하여 다채널전극을 이용한 신경신호 기록방법이 최근에 개발되어 널리 이용되고 있다. 다채널전극 기록 방식인 MEA60 시스템은 세포 밖에 위치한 60개의 전극이 생체신호를 동시에 기록한다. 세포 밖에 위치한 각각의 전극이 포착한 신경 신호는 하나의 망막신경절세포 반응이라기보다는 여러 세포의 반응이 동시에 기록될 가능성이 높다. 그러므로 여러 세포의 반응이 함께 기록된 신호로부터 각각의 세포로부터 나오는 파형을 구분하는 작업이 반드시 필요하다. 본 연구에서는 다채널전극으로 기록한 망막 신경절세포 신호로부터 MATLAB을 이용하여 활동전위 파형을 검출하고 분류하는 과정을 구현하여 보았다. 이러한 분류과정은 추후 진행되는 신호분석방법인 자극 후 시간 히스토그램(poststimulus time histogram, PSTH), 자기상관관계(autocorrelogram), 상호상관관계(cross-correlogram)를 보기 위하여 반드시 거쳐야 하는 전처리(preprocess) 과정이다. 본 연구에서는 MATLAB을 이용한 파형 구분 프로토콜을 확립하였을 뿐만 아니라 이러한 프로토콜이 신경절세포의 활동전위 파형을 검출하는 데 유용한 방법임을 입증하였다.

중심단어: 다채널전극, 망막신경절세포, 파형구분

### 서 론

대부분의 척추동물의 망막 신경망은 시세포(photoreceptors), 수평세포(horizontal cells), 양극세포(bipolar cells), 아마크린 세포(amacrine cells), 신경절세포(ganglion cells)로 구성된 5개의 층으로 분류된다. 망막(retina)에 빛자극이 인가되면 시세포층에서 전기신호로 변환된 후 수평세포, 양극세포, 아마크린세포를 거쳐 최종적으로 신경절세포 층(ganglion cell layer)에서 활동전위의 형태로 출력되게 된다.<sup>1,2)</sup> 세포내 또는 세포외에 단일 전극을 사용하여 단일 망막신경절세포의 활동전위를 기록하는 방법은 신경세포 개개의 특성을 알아내는 데는 유용한 방법이지만,<sup>2,4)</sup> 신경세포 간의 시간적, 공간적인 관계는 알아낼 수 없다. 이와 같은 한계를 극복하기

위한 새로운 방법으로 다채널전극을 이용한 신경 신호 기록방법이 이용되고 있다.<sup>5-11)</sup> 다채널 전극을 이용하여 기록한 신경세포의 활동전위를 분석하는 방법으로는 신경세포에 자극이 인가된 후 활동전위가 나타나는 시간과의 관계를 히스토그램으로 나타내어 분석하는 PSTH (post stimulus time histogram), 시간영역에서 신경세포간의 상관관계를 알아보는 방법인 상호상관관계(cross-correlation) 등을 들 수 있다. 이러한 분석을 하기 위해서는 기록된 신호에서 활동전위 파형을 구분하고, 활동전위가 나타난 시간을 알아내는 것이 필수적이다.<sup>12-14)</sup> 본 논문에서는 Fig. 1의 구성도에서 나타난 것처럼 토끼망막 신경절세포의 활동전위를 분석하기 위한 전처리 과정을 MATLAB (version 6.5 MathWorks Inc, Natick, MA, USA)을 이용하여 구현하여 보았다. 즉 활동전위를 기록한 후 파형을 검출, 정렬하고 정렬된 파형을 주성분분석(PCA, principal component analysis)을 이용하여 2차원 평면상에 프로젝션하고, 프로젝션 화면에서 육안으로 구분 가능한 파형을 클러스터링 하였고, 클러스터링 영역이 대변하는 각각의 파형을 얻음과 동시에 파형의 발생시점에 관한 데이터를 얻어내었다.

본 연구는 과학기술부/한국과학재단 우수연구센터 육성사업의 지원으로 수행되었음(과제번호: R11-2000-075-01002-0).

이 논문은 2005년 9월 8일 접수하여 2005년 9월 20일 채택되었음.

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

충북대학교 의과대학 생리학교실

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

Email: ysgoo@chungbuk.ac.kr

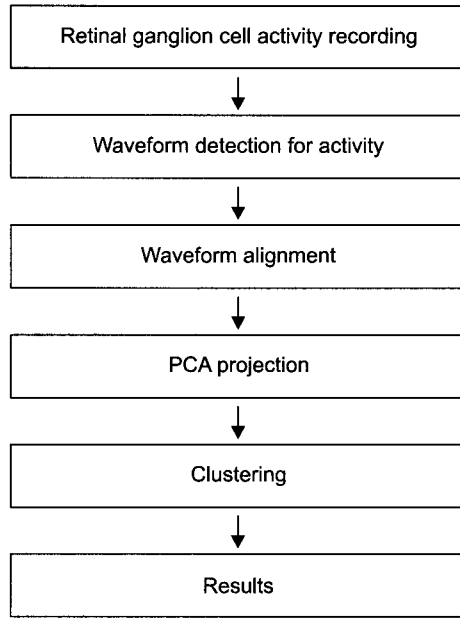


Fig. 1. Schematic diagram of sorting process for retinal ganglion cell waveform.

## 재료 및 방법

### 1. 망막신경절세포 활동전위 기록

망막 신경절세포의 활동전위를 기록하기 위해서 MEA 60 시스템(Multichannel systems GmbH, Germany)을 사용하였다. MEA 60 시스템은 1. Integrated 60 channel pre- and filter-amplifier (MEA 1060): amplification (X1200), bandpass filter (10~3,000 Hz) 2. PC based data acquisition system의 2 부분으로 구성되어 있다. 데이터 획득 시스템이 제공하는 최대 데이터 수집률은 50 kHz/channel이고, 실험에서는 25 kHz/channel을 사용하였다.

망막의 활동전위를 기록하기 위한 전극은 다채널전극(multielectrode array, MEA)을 사용하였다. MEA는 5×5 cm의 glass plate의 중심부에 8×8 배열로 구성되어 있고 (conducting layer: TiN, insulating cover: Si<sub>3</sub>N<sub>4</sub>), 각 배열소자를 구성하는 전극의 직경은 30 μm, 전극간 거리는 200 μm, 1 kHz에서 50 kΩ 수준의 낮은 임피던스를 갖는다.<sup>15)</sup> 망막 신경절세포의 활동전위를 기록하고자 토끼를 마취시키고, 안구를 적출하여 망막을 분리한 후 전극에 붙이기 적합한 크기로 잘라 신경절세포(ganglion cell) 층이 전극방향을 향하도록 붙이고 망막의 활동전위를 기록하였다.<sup>14)</sup> Fig. 2는 본 연구에서 사용한 다채널기록시스템(MEA 60 system) 및

다채널 전극에 망막조직을 붙인 상태의 사진(d. Left)과 MEA 60 시스템을 사용하여 망막 신경절세포의 활동전위를 기록시 실시간 모니터 화면(d. Right)을 보여주고 있다. 60개의 전극에 대응되는 모니터상의 60개의 작은 창을 더블 클릭하면 창이 확대되어 상세한 관찰이 가능하고, 4개의 모서리 채널은 외부 자극신호의 시점을 아는 데 이용된다.

### 2. 주성분분석

주성분분석은 상호 연관된 다수개의 양적 변수들간의 공분산 관계로부터 소수개의 원 변수들의 선형결합으로 표현되는 주성분으로 나타내어 데이터의 차원을 줄여주는 다변량분석법이다.<sup>16)</sup> MEA 60 시스템으로 기록한 토끼망막 신경절세포의 활동전압을 식 (1)과 같이 N개의 벡터 샘플로 나타낼 수 있다.

$$X_1 = [\chi_1 \ \chi_2 \ \chi_3 \dots \chi_n]^T$$

$$X_2 = [\chi_1 \ \chi_2 \ \chi_3 \dots \chi_n]^T$$

$$\vdots$$

$$X_N = [\chi_1 \ \chi_2 \ \chi_3 \dots \chi_n]^T$$

(1)

식 (1)의 각각 요소에 대한 평균  $M_X$ 는 다음의 식 (2)와 같이 구한다.

$$M_X = \frac{1}{N} \sum_{k=1}^N X_k$$

(2)

공분산 행렬  $C_X$ 는 식 (3)을 이용하여 구할 수 있다.

$$C_X = \frac{1}{N-1} \sum_{k=1}^N (X_k - M_X) (X_k - M_X)^T$$

(3)

이와 같은 과정을 거쳐 구한 공분산 행렬  $C_X$ 로부터 1,853개의 정규 직교한  $\lambda$ 로 표시되는 주성분 값(principal component value)을 구하는 방법은 다음 식 (4)을 적용하여 구하였다.

$$\| C_X - \lambda \| = 0$$

(4)

$\phi$ 로 표시하는 주성분 벡터(principal component vector)는 식 (5)을 적용하여 구하였다.

$$C_X \phi = \lambda \phi$$

(5)

## 결 과

### 1. 활동전위 파형구분

MEA의 개개의 전극에 기록된 망막 신호의 형태는 Fig. 3의 (a)와 같이 나타난다. 기록된 원 데이터에서 신호가 없는 부분(잡음부분)의 표준편차( $\sigma$ )를 구한 후  $-3 \times \sigma$ 의 값

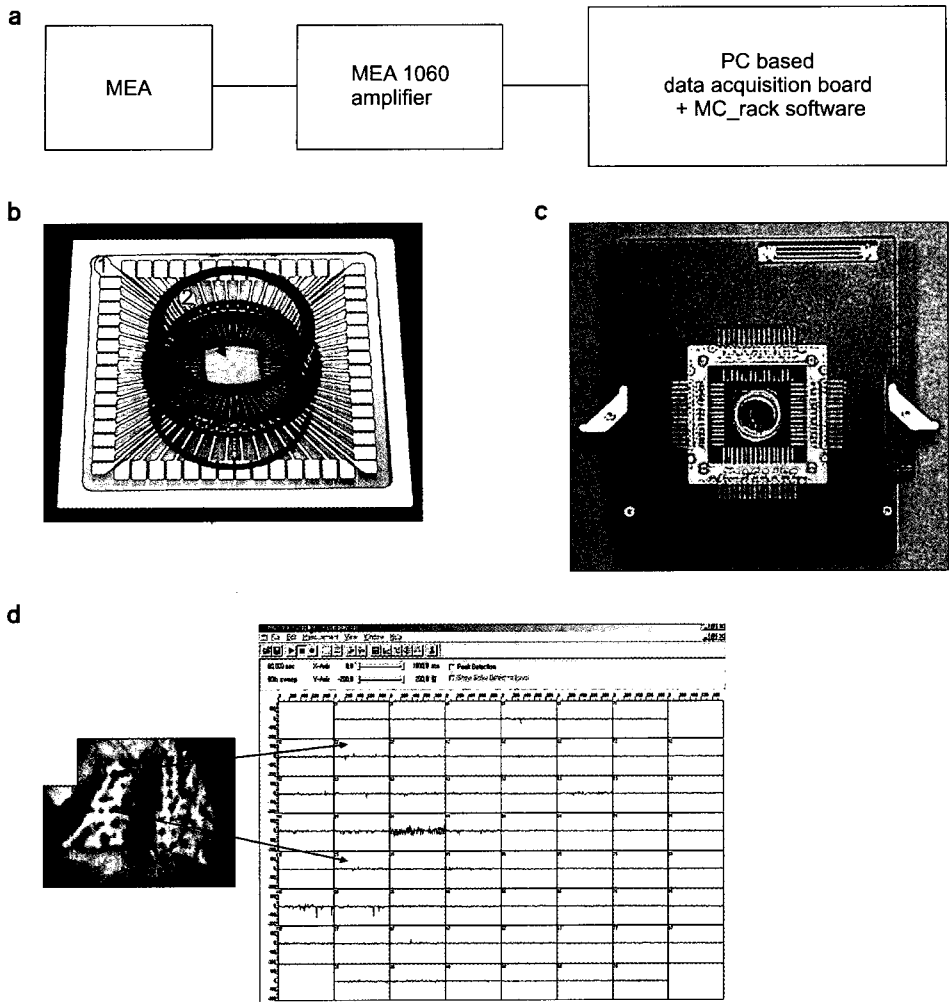


Fig. 2. Data recording system: MEA60 system. (a) Components of MEA60 system. (b) Multielectrode array (MEA) composed of 8×8 arrays. 1: Connector contacts to the MEA 1060-AMP, 2: Specimen slide with electrode field (8×8). (c) The MEA 1060-AMP is a 60-channel pre-amplifier/filter amplifier designed for the signal extraction from electrophysiologically active biological tissue. (d) Retinal piece attached on MEA (left) and real time recording window using MC\_Rack Software (right).

을 잡음의 역치 즉 활동전위 파형검출 레벨로 정하였다. Fig. 3의 (b)와 같이 활동전위 파형검출 레벨의 값보다 같거나 작은 값을 만나는(crossing) 순간, 그 점을 기준으로 하여 앞부분 10개의 데이터 값과 기준점을 포함하는 뒷부분의 데이터 값 30개, 모두 40개의 데이터 값에 의해 하나의 파형이 구성된다. 그 이유는 본 연구에서 활동전위를 기록하기 위한 데이터 수집률을 25 kHz 로 설정하였으므로 데이터 값의 시간간격은 40 μsec이었다. 일반적인 신경세포의 활동전위의 기간이 1,000 μsec 내외이며, 본 연구에서는 활동전위 파형을 충분히 나타내도록 시간간격을 1,600 μsec로 정하였으므로 하나의 활동전위 파형을 이루는 샘플의 개수는 40개가 된다. Fig. 3의 (c)는 활동전위 파형검출을 통하여 얻은 1,853개의 활동전위 파형을 하나의 창에 중첩시켜 나타낸 것이다. Fig. 4는 Fig. 3의 파형구분 작업을 수행하기 위하여 프로그래밍한 MATLAB M-파일의 중요 부분을

나타낸 것이다.

2. 주성분분석을 통한 파형 클러스터 찾기

Fig. 5의 (a)는 Fig. 4의 과정을 통하여 얻은 1,853개의 파형을 겹쳐서 나타낸 것이다. 1,853개 파형의 주성분분석을 통하여 구한 주성분 값에서 첫 번째와 두 번째의 주성분을 (b)와 같이 2차원 평면에 투사하였다. (a)에서 빨간 점선으로 그려놓은 하나의 파형은 (b)의 한 점(906번째)으로 나타낼 수 있었다. 투사된 영상으로부터 두 개의 클러스터 A, B를 육안으로 구분하였다. 자동화된 클러스터링은 아직까지 유용성이 떨어지는데 그 이유는 망막 신경절세포의 활동전위를 클러스터링 하였을 때 경계면이 뚜렷하지 않아 자동으로 구분이 불가능한 것이 많기 때문이다. (c)에서 A, B 두개의 클러스터를 얻은 다음에 (d)에 각 클러스터가 대변하는 파형을 나타내었다. 그리고 (e)는 파형이 나타난 시

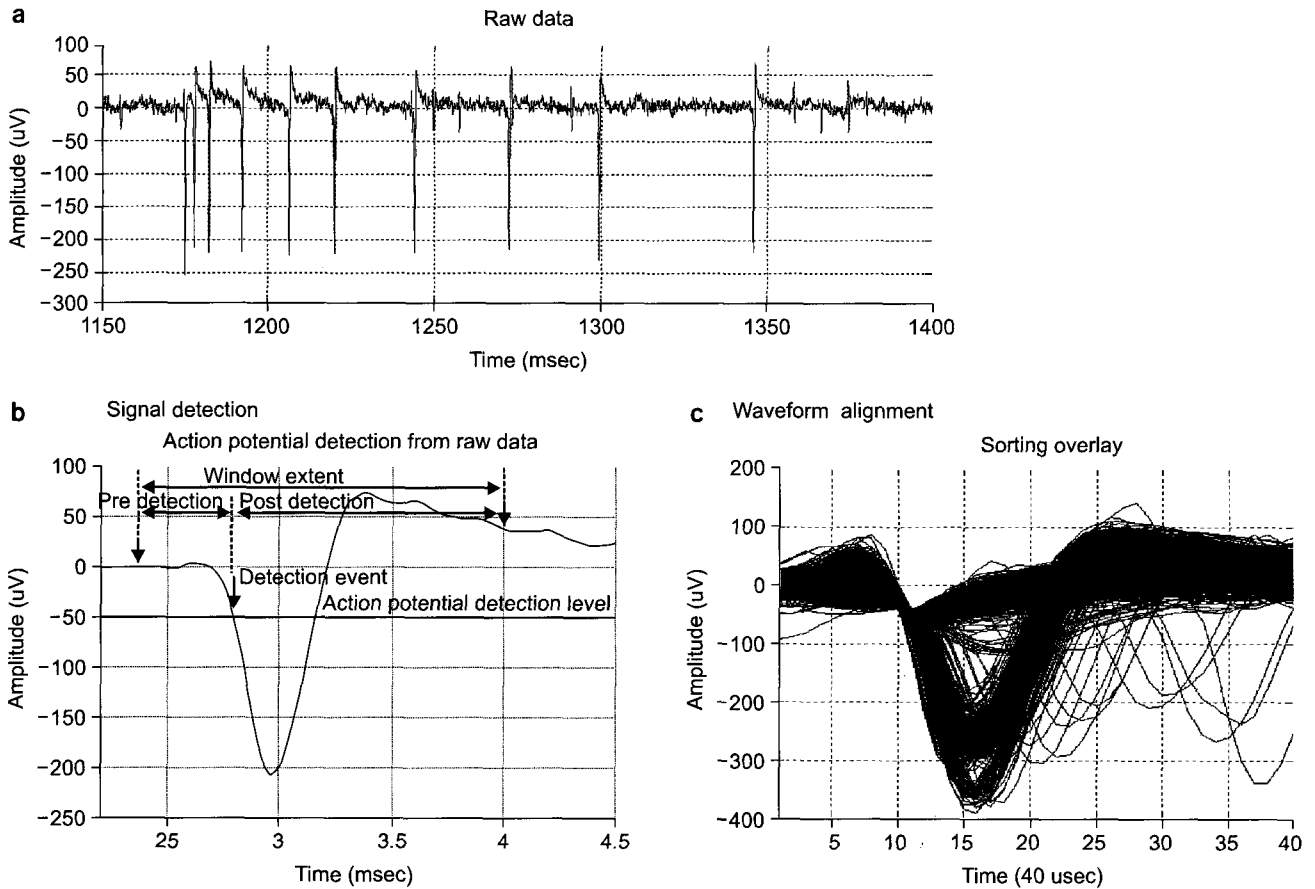


Fig. 3. Spike sorting process. (a) Spontaneous retinal ganglion cell activity recorded with one of MEA channel. X axis: time (msec), Y axis: amplitude ( $\mu\text{V}$ ). (b) Signal was detected when the original recording data crosses the detection level. Duration of window was set with 1,600  $\mu\text{sec}$ . (c) Waveform window shows the superimposed waveforms ( $n=1,853$ ) aligned at the threshold crossing times.

```

While (n <= m - 35)
  if (rawdata (n, 2) <= -34)
    time (k) = rawdata (n, 1);
    amplitude (1 : 40, k) = rawdata (n - 10 : n + 29, 2);
    k = k + 1;
    n = n + 40;
  else
    n = n + 1;
  end
end
    
```

Fig. 4. MATLAB M-files for waveform sorting.

간 값(Time stamp)을 보여주며 그 값은 활동전위 파형검출 레벨의 값과 같거나 작은 값을 만나는 기준점으로부터 구하였다.

### 고찰 및 결론

눈에 가해진 시각적인 정보는 망막의 신경절세포에서 활동전위로 변환되고, 시신경을 통하여 대뇌의 시각피질까지 전달한다. Hartline이 빛 자극에 대한 신경절세포의 반응 유형에는 ON 반응, OFF 반응, ON-OFF 반응이 있다는 것을 처음으로 보고<sup>17)</sup>한 이래 지금까지의 망막 신경절세포의 전기생리학적 연구는 주로 개개의 세포 반응에 초점이 맞추어졌다. 그러나 망막을 구성하고 있는 세포들은 상호 연관된 신경망으로 되어 있어서 국소적인 부위에 빛 자극이 가해지더라도 이를 처리하기 위해서 망막신경망의 수많은 세포들이 관여하므로, 과거의 단일세포 기록법에 의한 분석은 한계를 가지고 있다. 이에 본 연구에서는 최근에 개발된 다채널기록법을 사용하여 망막신경절세포 집단의 활동전

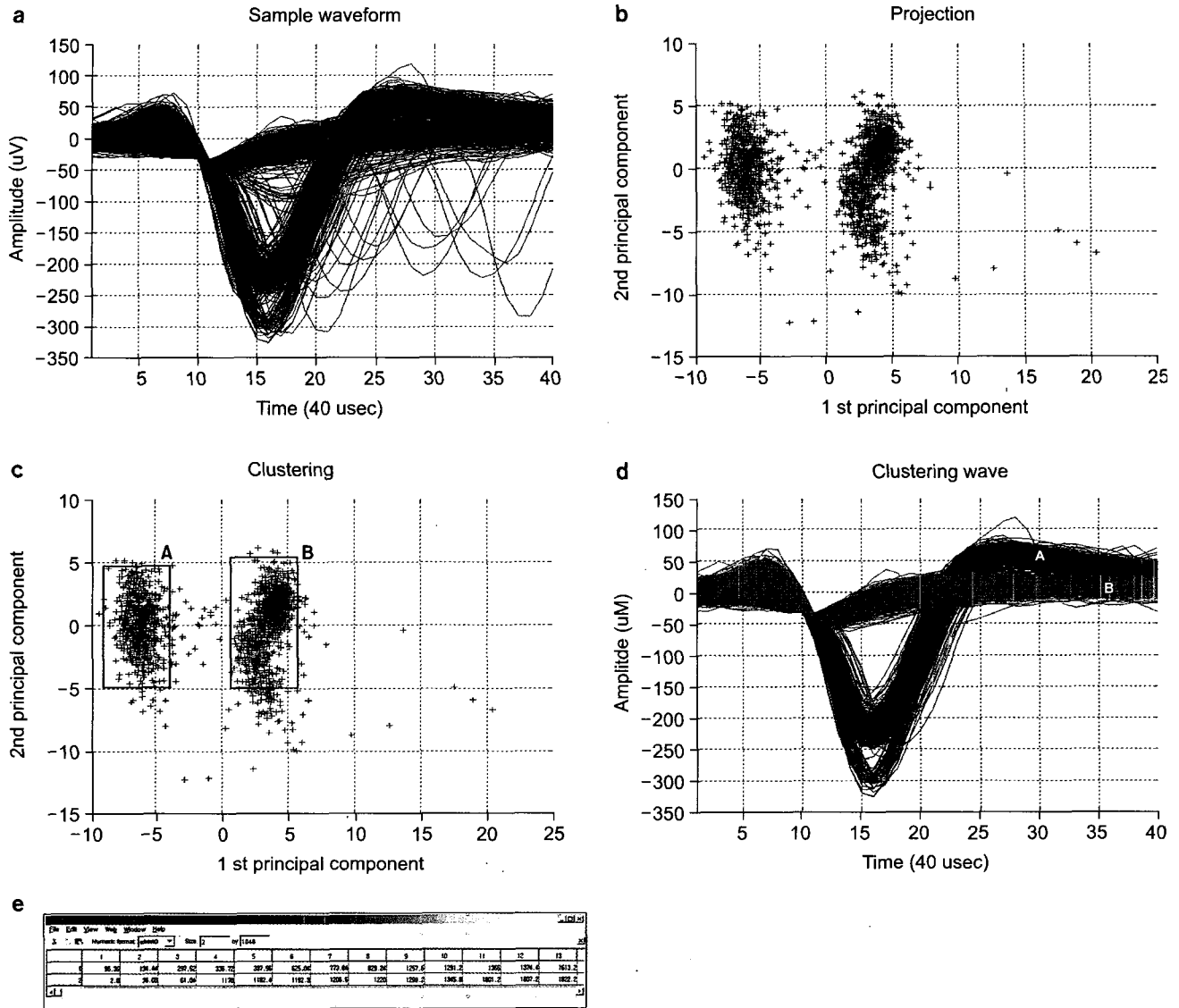


Fig. 5. Waveform detection from PCA-based Cluster. (a) Waveform window which shows all 1,853 waveforms. Each waveform is composed of 40 sampling points. (b) 2D projection of PCA-based clusters. Each 1,853 cross bar represents each waveform of (a). (c) Two user chosen clusters (A and B) were shown. (d) Two waveforms which represent two PCA-based clusters were shown with different colors. (e) Time stamps which are real time values (msec) when each waveform fires.

위를 기록하여 개개의 신경세포 단위가 아닌 망막신경망 전체에 대하여 분석하고자 하는 연구를 시작하였다. 멀티뉴론 연구의 가장 기본은 개개의 뉴론과 관계있는 신호(spike)를 구분(sorting)하여 찾아내는 과정으로부터 시작된다. 즉 다채널전극을 사용하여 여러 개 망막 신경절세포로부터 유래되는 활동전위를 기록한 후 개개의 신호를 구분하는 과정을 거치고, 이어서 그 신호를 만들어 내는 각 뉴론들끼리의 시간적, 공간적 흥분발사 패턴을 이해함으로써 궁극적으로 시각정보 인코딩 기전을 밝히는 것이 가능할 것이

다.<sup>8,13)</sup>

본 연구자들은 이미 한국의학물리학회지(제 14권 제 4호)에 발표한 논문(주성분분석을 이용한 토끼 망막 신경절세포의 활동전위 파형 분류)<sup>14)</sup>에서 주성분분석을 통하여 망막신경절세포의 활동전위를 각 세포별로 분류할 수 있음을 보였다. 본 논문과 기발표된 논문의 차이는 본 논문에서는 MATLAB으로 활동전위 파형분류를 하는 과정을 구현하였고 14권 4호에 실린 논문에서는 상용프로그램인 Offline sorter에서 제공하는 분석방법을 이용하였다는 점이다. 본 연

구에서 사용한 MATLAB은 사용자가 요구하는 기능의 확장성과 유연성이 매우 높고 단순한 GUI (graphical user interface) 프로그램에 수많은 수학적 기능들을 부여할 수 있어서 아주 강력한 응용개발이 가능하여 많은 사람들이 사용하는 프로그래밍 언어이지만 반면 완전한 그래픽 환경이 아니라서 적용 가능한 함수를 모르면 이용이 불가능하다는 단점을 가지고 있다.<sup>18)</sup> 본 연구에서 MATLAB을 이용하여 활동전위 파형구분 방법을 구현한 이유는 첫째, Offline Sorter가 사용하고 있는 주성분분석 방법의 타당성을 다시 한 번 검증해봄으로써 파형구분의 1차 스크리닝 방법으로 Offline Sorter를 계속 사용할 당위성을 찾고 싶었고 둘째, Offline Sorter에서 저장되는 파일은 호환성이 없어서 다양한 분석프로그램에서 활용이 불가능하며 미세한 활동전위 파형검출 레벨 설정을 할 수 없었기 때문이다. 활동전위 파형구분에 대한 Offline Sorter의 결과 값과 MATLAB의 결과 값의 차이점은 없었으나, 중간과정에서 값의 부호 차이를 발견할 수 있었다. 중간 값의 차이는 MATLAB은 기본적으로 열을 기준으로 계산을 하는데 반하여 Offline Sorter는 행을 기준으로 계산한 결과에 의한 것으로 추정된다. 이렇듯 Offline Sorter와 MATLAB 간의 근본적인 차이점을 발견할 수 없었고 MATLAB으로 구현한 전처리 과정이 스크립트 형식을 이용함으로써, 그래픽환경인 Offline Sorter와 같은 상용프로그램에 비하여 이용이 불편하였으므로 본 연구진은 파형구분을 위하여 Offline Sorter를 계속 사용하기로 결정하였다. Offline Sorter의 단점으로 지적된 파일의 호환성 문제는 본 연구진이 심층적인 신호처리를 위해 사용하는 Neuroexplorer™라는 분석 프로그램에서는 Offline sorter에서 생성된 파일을 그대로 읽을 수 있으므로 해결되었다. 그러나 앞으로 MATLAB을 그래픽환경으로 개선하면 Offline Sorter가 제공해주는 장점을 충분히 제공해 주리라 사료된다.

본 연구에서는 다채널 기록방법을 이용하여 토끼 망막에서 기록한 신호로부터 신경절세포의 활동전위 파형을 구분하는 과정을 MATLAB으로 구현하여 보았다. 추후 다채널 기록법을 이용하여 망막신경절세포 사이의 시간적, 공간적 흥분발사 패턴을 분석하여 시각정보 처리기전을 연구하고자 하며 이러한 연구는 그 자체로도 충분한 전기생리학적 의의가 있을 뿐 아니라, 나아가 망막 신경망의 손상으로 시력을 상실한 사람에게 시각경로상의 여러 단계에서 신경을 자극함으로써 시력을 회복시키려는 인공시각장치의 개발 분야에 기초 자료로 활용될 수 있을 것이다.

## 참 고 문 헌

1. <http://webvision.umh.es/webvision/sretina.html>
2. Dowling JE: *The retina, an approachable part of the brain.* 1st ed. Harvard University Press, Cambridge, MA (1987), pp. 12-41
3. Stone J: *Parallel Processing in the Visual System.* 1st ed. Plenum, New York (1983), pp. 83-108
4. Wassle H, Boycott BB: Functional architecture of the mammalian retina. *Physiol Rev* 71:447-480 (1991)
5. Egert U, Heck D, Aertsen A: Two dimensional monitoring of spiking networks in acute brain slice. *Exp Brain Res* 142: 268-274 (2002)
6. Gopal KV, Gross GW: Auditory cortical neurons in vitro: cell culture and multichannel extracellular re-cording. *Acta Otolaryngol* 116:690-696 (1996)
7. Nicolelis MAL, Baccala LA, Lin RCS, Chapin JK: Sensorimotor encoding by synchronous neural ensemble activity at multiple levels of the soma-to-sensory system. *Science* 268: 1353-1358 (1995)
8. Meister M, Pine J, Baylor DA: Multineuronal signals from the retina: acquisition and analysis. *J of Neuroscience Meth* 51: 95-106 (1994)
9. Wilson MA, McNaughton BL: Dynamics of the hippocampal ensemble code for space. *Science* 261:1055-1058 (1993).
10. Nordhausen CT, Maynard EM, Normann RA: Single unit recording capabilities of a 100 microelectrode array. *Brain Res* 726:129-140 (1996)
11. Della Santina CC, Kovacs GT, Lewis ER: Multi-unit recording from regenerated bullfrog eighth nerve using implantable silicon-substrate microelectrodes. *J Neurosci Methods* 72: 71-86 (1997)
12. Nicolelis MAL: *Methods for NEURAL ENSEMBLE RECORDINGS.* 1st ed. CRC Press, New York (1999), pp. 129-135
13. Meister M, Berry MJ: The neural code of the retina. *Neuron* 22:435-450 (1999)
14. Jin GH, Cho HS, Lee TS, Goo YS: PCA-based Waveform classification of rabbit retinal ganglion cell activity. *Korean J Medical Physics* 14:211-217 (2003)
15. Egert U, Schlosshauer B, Fennrich S, et al: A novel organotypic long-term culture of the rat hippocampus on substrate-integrated multielectrode arrays. *Brain Res Protoc* 2:229-242 (1998)
16. Jolliffe IT: *Principle Component Analysis.* 1st ed. Springer-Verlag, New York (1986), p 271
17. Hartline HK: The response of single optic nerve fibers of the vertebrate eye to illumination of the retina. *American J. Physiology* 121:400-415 (1938)
18. Egert U, Knott T, Schwarz C, et al: MEA-tools: an open source toolbox for the analysis of multielectrode-data with MATLAB. *J Neurosci Meth* 177:33-42 (2002)

## **Waveform Sorting of Rabbit Retinal Ganglion Cell Activity Recorded with Multielectrode Array**

Gye Hwan Jin\*, Tae Soo Lee\*, Yong Sook Goo<sup>†</sup>

Departments of \*Biomedical Engineering and <sup>†</sup>Physiology,  
Chungbuk National University Medical School, Cheongju, Korea

Since the output of retina for visual stimulus is carried by neurons of very diverse functional properties, it is not adequate to use conventional single electrode for recording the retinal action potential. For this purpose, we used newly developed multichannel recording system for monitoring the simultaneous electrical activities of many neurons in a functioning piece of retina. Retinal action potentials are recorded with an extra-cellular planar array of 60 microelectrodes. In studying the collective activity of the ganglion cell population it is essential to recognize basic functional distinctions between individual neurons. Therefore, it is necessary to detect and to classify the action potential of each ganglion cell out of mixed signal. We programmed M-files with MATLAB for this sorting process. This processing is mandatory for further analysis, e.g. poststimulus time histogram (PSTH), auto-correlogram, and cross-correlogram. We established MATLAB based protocol for waveform classification and verified that this approach was effective as an initial spike sorting method.

---

**Key Words:** Multichannel recording system, Retinal ganglion cell, Spike sorting