

전기자극펄스에 대한 변성망막 신경절세포의 응답특성 분석

류상백¹, 이종승¹, 예장희², 구용숙², 김지현¹, 김경환¹

¹연세대학교 보건과학대학 의공학과, ²충북대학교 의과대학 생리학교실

Analysis of Neuronal Activities of Retinal Ganglion Cells of Degenerated Retina Evoked by Electrical Pulse Stimulation

Sang Baek Ryu¹, Jong Seung Lee¹, Jang Hee Ye², Yong Sook Goo², Chi Hyun Kim¹, Kyung Hwan Kim¹

¹Department of Biomedical Engineering, College of Health Science, Yonsei University

²Department of Physiology, Chungbuk National University Medical School

(Received June 17, 2009. Accepted July 15, 2009)

Abstract

For the reliable transmission of meaningful visual information using prosthetic electrical stimulation, it is required to develop an effective stimulation strategy for the generation of electrical pulse trains based on input visual information. The characteristics of neuronal activities of retinal ganglion cells (RGCs) evoked by electrical stimulation should be understood for this purpose. In this study, for the development of an optimal stimulation strategy for visual prosthesis, we analyzed the neuronal responses of RGCs in *rd/1* mouse, photoreceptor-degenerated retina of animal model of retinal diseases (retinitis pigmentosa). Based on the *in-vitro* model of epiretinal prosthesis which consists of planar multielectrode array (MEA) and retinal patch, we recorded and analyzed multiunit RGC activities evoked by amplitude-modulated electrical pulse trains. Two modes of responses were observed. Short-latency responses occurring at 3 ms after the stimulation were estimated to be from direct stimulation of RGCs. Long-latency responses were also observed mainly at 2 - 100 ms after stimulation and showed rhythmic firing with same frequency as the oscillatory background field potential. The long-latency responses could be modulated by pulse amplitude and duration. From the results, we expect that optimal stimulation conditions such as pulse amplitude and pulse duration can be determined for the successful transmission of visual information by electrical stimulation.

Key words : Retinal prosthesis, Photoreceptor degeneration, Retinal ganglion cell, Electrical Stimulation, Neural spike train, Field potential

1. 서론

망막색소변성(Retinitis Pigmentosa, RP)과 황반변성(Age-related Macular Degeneration, ARMD)은 망막의 광수용체(Photoreceptor)가 손상되어 시력을 상실케 하는 대표적인 망막의 퇴행성 질환이다. 하지만, 이러한 질환으로 인해 시력을 완전히 상실하게 되더라도 시신경을 구성하고 있는 망막신경절세포(RGC, retinal ganglion cell) 및 그 이후의 시각경로는 손상되지 않고 남아있는 경우가 보고 되고 있다[1]. 인공시각장치는 이러한 환자의 망막을 전기적으로 자극하는 방법을 통해 시각정보를 전달하여 시각기능을 회복시키기 위해 고안된 장치이다 [2]. 시각정보를 전달하기 위해 망막뿐만 아니라 시신경 또는 시각피질을 직접

자극하는 방법도 연구되고 있으나, 망막을 직접 자극하는 방법이 시각경로의 가장 앞쪽에서 자극을 제시하기 때문에 그 이후에 남아있는 신경경로(neural pathway)의 신경정보처리 과정을 그대로 이용할 수 있다는 장점이 있기 때문에 망막을 자극하는 방법이 비교적 활발하게 연구되고 있다 [3]. 현재 이러한 인공시각장치를 위한 연구로서 시력상실환자를 대상으로 한 임상실험[4,5], 자극전극 개발[6] 및 시각피질에서 유발되는 반응관찰[7] 등과 같이 여러 분야에서 세계적으로 연구가 활발하게 이루어지고 있다.

하지만, 무엇보다 인공시각장치를 통해 의미 있는 시각정보가 전달되기 위해서는 입력되는 시각정보를 바탕으로 전기자극펄스(electrical stimulation pulse)를 생성하여 망막을 자극하였을 때, 이에 응답하는 망막신경절세포의 반응이 입력되는 시각정보를 충실하게 전달할 수 있어야 하기 때문에, 망막신경절세포의 자극에 대한 반응을 기반으로 한 자극방법의 개발이 반드시 필요하다[8]. 또한, 인공시각장치의 대상이 되는 시력 상실환자의 망막은 망막 질환으로 인해 망막이 손상되어 정상망막과는 다른 특성을 보이기

Corresponding Author : 김경환

강원도 원주시 흥업면 매지리 234번지 연세대학교 원주캠퍼스 의공학과

Tel : +82-33-760-2364 / Fax : +82-33-763-1953

E-mail : khkim0604@yonsei.ac.kr

본 연구는 교육과학기술부 지역대학우수과목자 지원사업 (과제고유번호: KRF-2007-521-H00008) 및 보건복지부 보건의료기술진흥사업 (과제고유번호: A050251)의 지원에 의하여 이루어진 것임.

때문에 [9,10], 변성망막의 응답특성을 기반으로 자극방법을 개발하는 것이 함께 진행되어야만 한다.

본 연구에서는 인공시각장치의 최적의 자극방법의 개발을 위하여 다채널 전극 (MEA, multi-electrode array) 및 망막색소변성에 대한 유전자변형 동물모델인 *rd1* 마우스의 망막을 이용하여 epiretinal 형태 인공시각장치의 *in-vitro* 모델을 구성하고 이를 이용하여 전기자극에 응답하는 변성망막의 망막신경절세포의 반응에 인코딩되어 있는 신경정보를 정량적으로 관찰하는 것을 목표로 하였다. 특히, 자극펄스의 진폭변조 (amplitude modulation)에 의하여 입력되는 시각정보 중 가장 중요한 빛의 밝기 변화에 대한 정보를 시각중추신경계에 전달할 수 있다는 가설을 세워 다양한 세기의 자극에 대해 망막신경절세포의 반응이 어떻게 반응하는지를 관찰하였다.

II. 방법

A. 망막 분리 방법

실험을 위해 변성망막 동물모델인 *rd1* 마우스 (C3H/HeJ strain) 를 사용하였다. 망막 분리과정은 참고문헌[11]의 실험방법을 참고로 하였다. 망막분리 과정을 간단히 요약하면 다음과 같다. 마취된 마우스의 안구를 적출한 뒤, 적출한 안구에 인공 뇌척수액 (artificial cerebrospinal fluid, ACSF solution, 124 mM NaCl, 10 mM glucose, 1.15 mM KH_2PO_4 , 25 mM NaHCO_3 , 1.15 mM MgSO_4 , 2.5 CaCl_2 , 5 mM KCl; pH = 7.4)을 주입하면서 다음의 방법으로 망막절편을 얻었다. 먼저 망막의 전면에 있는 구조물(각막, 수정체, 초자체)을 모두 제거한 후에, 시신경이 부착되어 있는 부위를 가위로 잘라줌으로써 얇은 투명종이 형태의 망막을 얻어내었다. 이렇게 얻은 망막을 전극에 붙이기 적합한 크기 ($\sim 5 \times 5$ mm)로 잘라낸 후, 망막신경절 세포 부위가 다채널 전극의 전극 쪽을 향하도록 부착하였다. 실험이 진행되고 있는 동안에는 온도 조절기를 통하여 망막의 온도를 32°C 로 일정하게 유지하면서 다채널 전극을 통해 망막 활동신호를 기록하였다.

B. 다채널 전극 및 기록 시스템

망막의 활동신호를 기록하기 위한 전극으로써 64채널 다채널 전극 (MEA, Multichannel Systems GmbH, Germany)를 사용하였다. MEA는 5×5 cm의 유리판의 중심부에 8행 \times 8행의 배열로 구성되어 있는 전극들을 포함하고 있으며 전도층은 TiN로, 절연층은 Si_3N_4 로 구성되어 있다. 각 전극은 직경은 $30 \mu\text{m}$ 의 원형이고, 전극간 거리는 $200 \mu\text{m}$ 이며, 1 kHz에서 $50 \text{k}\Omega$ 수준의 낮은 임피던스를 갖는다.

신호 기록을 위한 시스템으로는 MEA60 system (Multichannel Systems)을 사용하였다. MEA60 system은 크게 통합형 60 채널 증폭기 및 필터인 MEA1060 (증폭도: $\times 1200$) 부분과 PC를 기반으로 한 데이터 획득 소프트웨어 (MC_Rack, Multichannel

Systems) 부분의 두 부분으로 구성되어 있다. 데이터 분석은 MC_Rack을 통해 각 채널에서 활동신호를 기록한 뒤, MC Data Tool (Multichannel Systems)을 이용하여 text file로 변환한 후, 추가 분석을 수행하였다.

C. 세기가 변조된 전기자극

전기자극 펄스에 응답하는 망막신경절세포의 응답을 관찰하기 위해서 양극(anodic) 펄스가 먼저 입력되는 균형전하 이상펄스 (charge balanced biphasic pulse)을 생성하였고, 자극 펄스의 세기는 2, 5, 10, 20, 30, 40, 50 μA , 자극 펄스의 폭은 60, 100, 200, 500, 1000 μs 로 구성하였다. 이렇게 구성된 전기 자극은 4초에 한 번씩 각 세기당 20회씩 무작위의 순서로 60개의 다채널 전극 중 중심에 있는 하나의 채널을 통해 자극 생성기 (STG 1004, Multichannel systems, GmbH, Germany)로부터 망막패치에 전달되었고, 이에 응답하는 망막신경절세포의 반응을 나머지 채널에서 기록하였다. 자극펄스의 세기 및 펄스폭의 변화에 대한 망막신경절세포의 반응 변화를 관찰하기 위해서 자극이 제시된 후에 유발되는 활동전위 (action potential 또는 spike)의 개수를 세어 반응곡선 (response curve)를 구성함으로써 자극 펄스의 세기 및 펄스폭에 따른 망막신경절세포의 반응을 정량적으로 관찰 및 비교하였다.

D. 망막신경절세포의 활동전위(spike) 획득 및 분석

망막에 전기자극을 제시하면 크게 짧은 반응시간을 갖는 반응 (short-latency response)과 긴 반응시간을 갖는 반응(long-latency response)이 관찰되는 것으로 알려져 있다 [12]. 이중 전자는 망막신경절세포의 직접적인 자극에 의해 나타나는 반응이며, 자극이 제시된 직후 약 2~5 ms 이내에 발생하게 되어 주로 펄스 아티팩트 (artifact)와 함께 나타나기 때문에 약물처리를 통해 활동전위를 억제 후 기록된 펄스 아티팩트 파형을 활동전위가 포함된 아티팩트 파형과의 차이를 구하거나, 펄스 아티팩트의 평균 파형을 일종의 템플릿 (template)으로 만들어 활동전위가 발생한 파형과의 차이를 구하는 방법(template subtraction)을 이용하여 검출하게 된다 [12]. 본 실험에서는 같은 세기의 자극이 제시되었을 때에 반응시간이 짧은 반응이 나타난 파형과 나타나지 않은 파형을 구분할 수 있었기 때문에, 그림 5 (a)와 같이 반응이 없는 파형의 템플릿을 만들어 반응이 나타난 파형과의 차이를 구함으로써 펄스 아티팩트와 함께 나타난 활동전위를 검출하는 template subtraction 방법을 사용하였다.

긴 반응시간을 갖는 활동전위들은 자극에 응답하는 반응이 망막에 남아있는 시냅스들을 거쳐서 발생하기 때문에 짧은 반응시간을 갖는 활동전위의 발생 이후에 나타나게 되는데, 이러한 반응은 일반적으로 자극 아티팩트 (stimulation artifact)의 영향을 크게 받지 않기 때문에 배경잡음의 표준편차의 3배의 크기를 갖는 문턱치 (threshold)를 설정하여 활동전위를 검출하였다. 또한, 다채널 전극의 한 채널에서 하나 이상의 세포의 활동전위 (multiple neural

activity) 및 배경잡음이 함께 검출되는 것을 방지하기 위해, Offline sorter (Plexon, USA)를 사용하여 검출된 신호를 한 세포의 활동전위 (single unit activity)로 분류하는 과정을 거쳤다.

본 실험을 위해 총 3마리의 *rd1* 마우스로부터 총 3개의 망막패치를 얻었고, 위에서 언급한 검출과정을 통해 활동전위를 발생시키는 총 105개의 망막신경절세포를 구분 및 선택하였다. 이 중 자발적 활동 (spontaneous spike)이 과도하여 자극에 응답하는 반응을 뚜렷하게 관찰하기 어려운 세포 (8개), 자발적인 활동전위는 보이지만 자극에 응답하지 않는 세포 (29개), 자극에 대한 반응을 보이지만, 반응이 불안정하게 나타나는 세포 (14개)를 분석에서 제외하여, 총 54개의 망막신경절세포 대해서 관찰하였다.

III. 결과

A. 자발적 망막신경절세포 활동 특성

자극이 제시되지 않았을 때에 변성망막에서 나타나는 망막활동 (retinal activity)를 다채널 전극을 통해 기록한 결과, 그림 1 (a)에서 보인 것처럼 다수의 채널에서 정상망막에서는 관찰되지 않는 주기적 흥분 (oscillation) 현상과 활동전위가 함께 발생하는 것이 관찰되었다. 이러한 주기적 흥분은 망막신경절세포에서 발생하는 활동전위가 아니라 양극세포 (bipolar cell)에서 망막신경절세포로 유입되는 흥분성 글루타메이트 입력신호 (excitatory glutamate input)에 의해서 발생하는 것으로 알려져 있으며[9], 그림 1 (b)에서 보인 바와 같이 주기적 흥분과 함께 발생하는 활동전위들의 inter-spike interval (ISI) 히스토그램에서 두 개의 피크가 나타나는 것을 통해 활동전위가 주기적 흥분의 영향을 받아 주기적으로 발생하는 것을 확인할 수 있었다 [10].

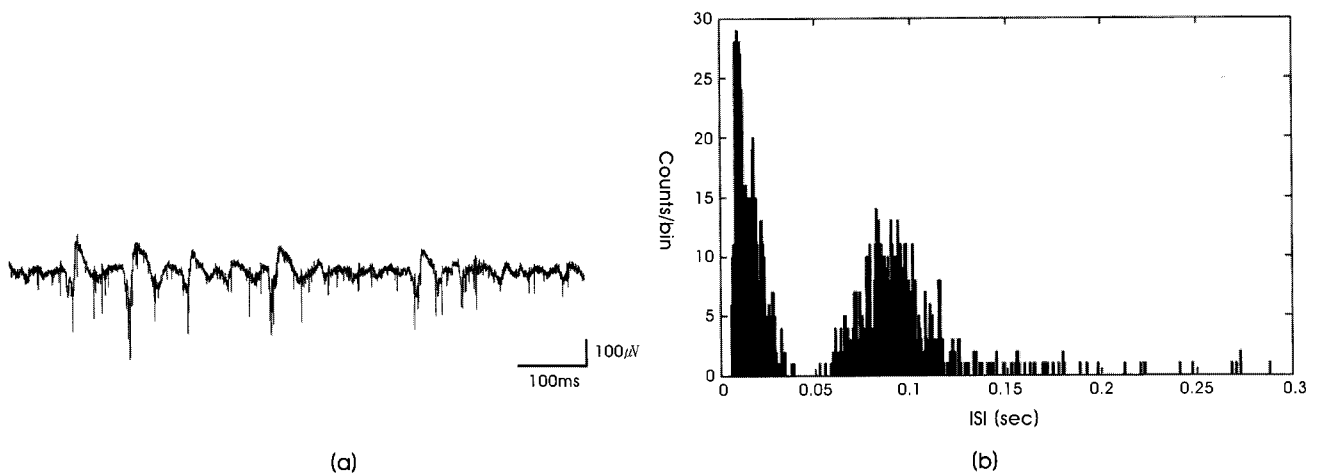


그림 1. (a) 다채널 전극에서 기록한 변성망막의 자발적 활동 (spontaneous activity), 활동전위(spike)와 함께 배경잡음에 비해 훨씬 큰 진폭으로 12 - 13 Hz 주파수로 진동하는 주기적 흥분 (oscillation)과 활동전위가 함께 관찰됨. (b) 자극을 제시하지 않고 1분간 기록한 자발적 활동파형으로부터 검출한 활동전위의 inter-spike interval (ISI) 히스토그램.

Fig. 1. (a) Spontaneous activity recorded by multielectrode array. Along with RGC spikes, oscillatory rhythmic activity with 12 - 13 Hz frequency is observed. (b) Inter-spike interval histogram obtained from 1 min recording of a spontaneous activity waveform.

B. 전기자극 응답 특성

1) 주기적 활동전위

실험에서 사용한 변성망막의 경우, 정상망막과는 달리 광수용체층 (photoreceptor layer)가 손상되었지만, 활동전위를 유발하는 망막신경절세포는 손상되지 않고 남아 있으므로, 전기자극에 반응하는 활동전위 응답을 기대할 수 있다. 자극에 응답하는 망막신경절세포의 반응은 자극의 조건들에 따라 크게 달라지기 때문에, 반응을 안정적으로 유발시키기 위한 적절한 자극의 조건들을 자극펄스의 펄스폭과 자극펄스의 세기 변화에 대한 반응을 관찰함으로써 결정하고자 하였다.

우선, 적절한 자극 펄스폭을 결정하기 위해 자극 펄스의 세기를 40 μ A로 고정한 상태에서 펄스폭만 60, 100, 200, 500, 1000 μ s로 증가시켜 보았다. 그림 2와 같이 펄스폭 60, 100 μ s의 경우에는 (그림 2 (a), (b)) 자극 펄스가 제시되기 전과 후에 자발적인 활동전위 (spontaneous spike)만 관찰되지만, 펄스폭 200, 500, 1000 μ s의 경우에는 (그림 2 (c), (d), (e)) 자극펄스가 제시된 후 100 ms 이내에 자극에 의해 유발되는 활동전위 (evoked response)가 발생하는 것이 관찰되었다.

다음 단계로써 자극의 세기 증가에 따라서는 망막신경절세포의 반응이 어떻게 달라지는지 알아보기 위해서 먼저 자극의 세기 2, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60 μ A 를 20회씩 (총 160회)제시한 후, 그림 3과 같이 활동전위의 발생시점을 누적해서 그린 post stimulus time histogram (PSTH)을 통해 반응을 관찰해 보았다. 총 160회의 자극을 제시했음에도 자극 펄스폭 60, 100 μ s에서는 자극 시점 (그림에서 시간 0 일 때) 전과 후에 큰 변화가 없기 때문에 자극에 의한 반응이 유발되지 않았음을 알 수 있었다. 펄스폭 200 μ s에서는 크기는 작지만 자극에 의해 반응이 유발되었고 (그림 3(c)),

Analysis of Neuronal Activities of Retinal Ganglion Cells of Degenerated Retina Evoked by Electrical Pulse Stimulation

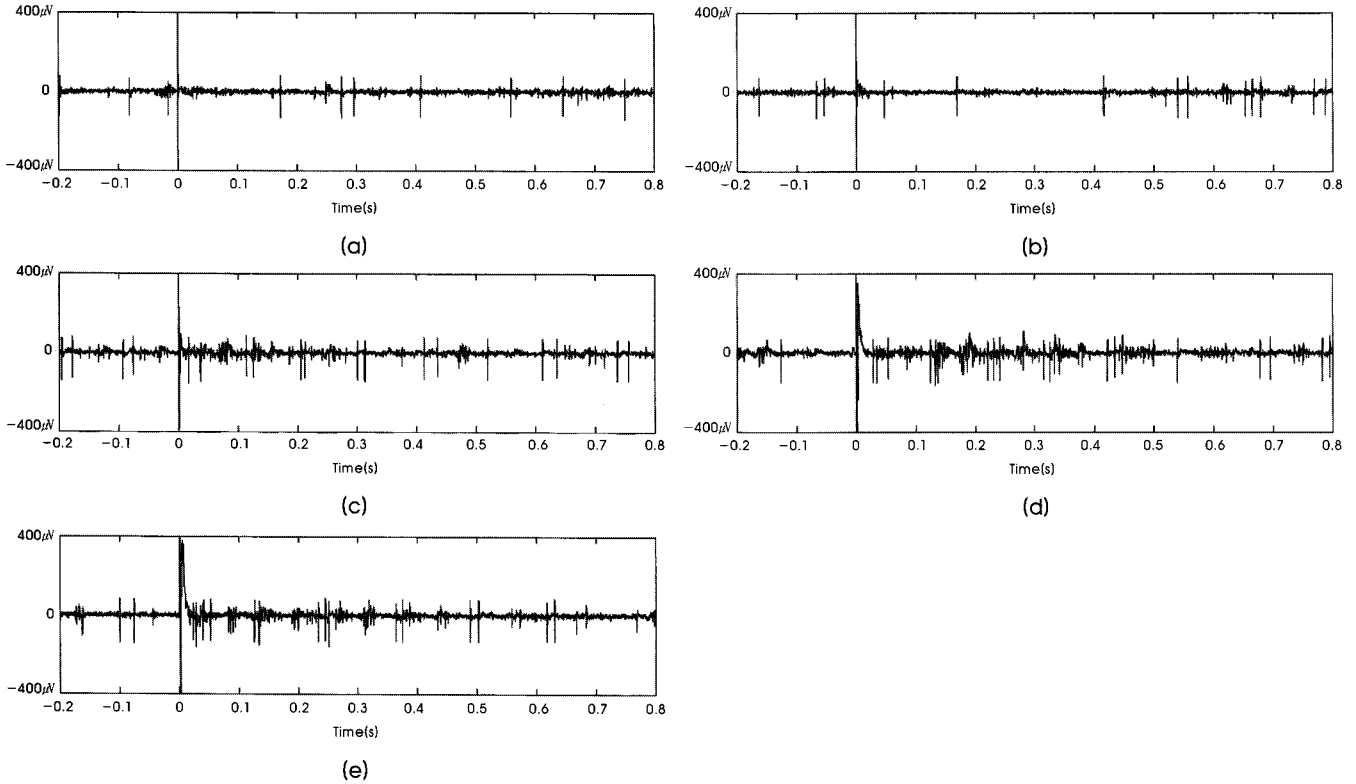


그림 2. 자극펄스의 세기가 40 μA 로 고정된 상태에서 자극펄스의 펄스폭을 (a) 60 μs , (b) 100 μs , (c) 200 μs , (d) 500 μs , (e) 1000 μs 로 변화시켰을 때 기록된 망막신경절세포의 응답신호.

Fig. 2. RGC responses to 40 μA pulses with various pulse durations. (a) 60 μs , (b) 100 μs , (c) 200 μs , (d) 500 μs , (e) 1000 μs .

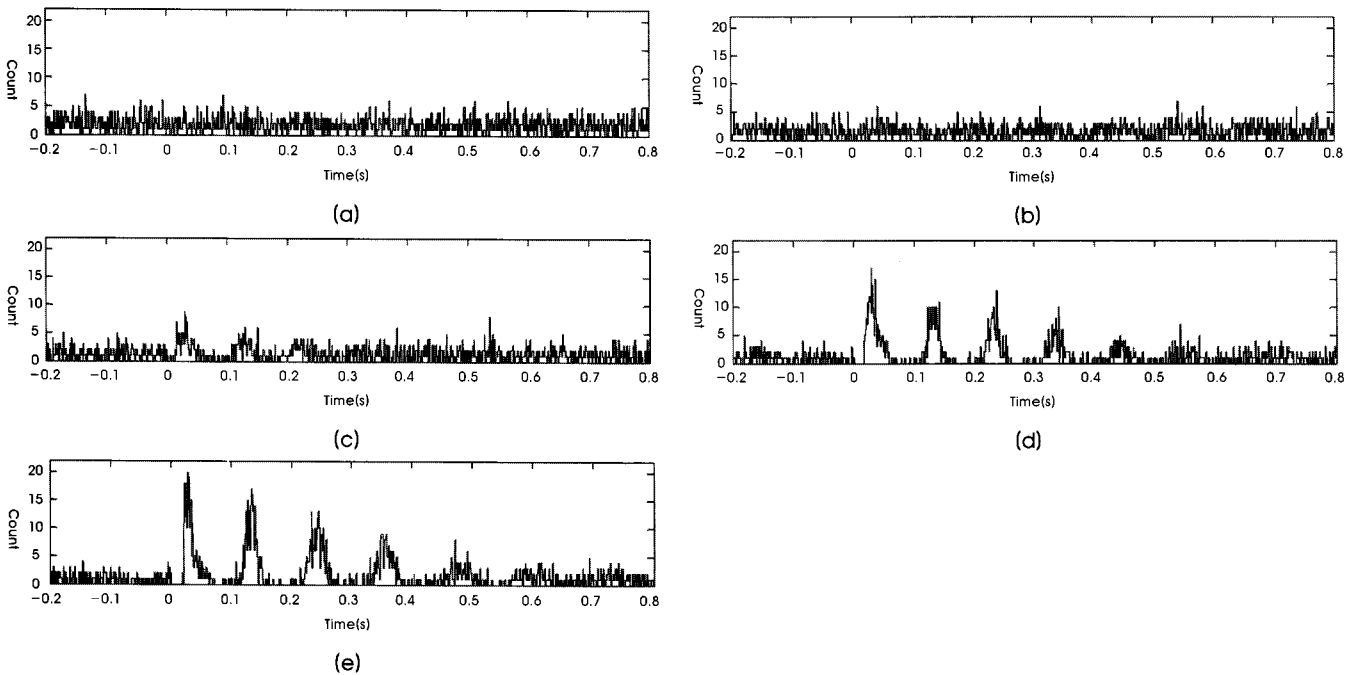


그림 3. 자극펄스의 펄스폭의 증가에 따른 PSTH의 변화 관찰 결과. (a) 60 μs , (b) 100 μs , (c) 200 μs , (d) 500 μs , (e) 1000 μs .

Fig. 3. Modification of PSTH with respect to the increase of pulse duration. (a) 60 μs , (b) 100 μs , (c) 200 μs , (d) 500 μs , (e) 1000 μs .

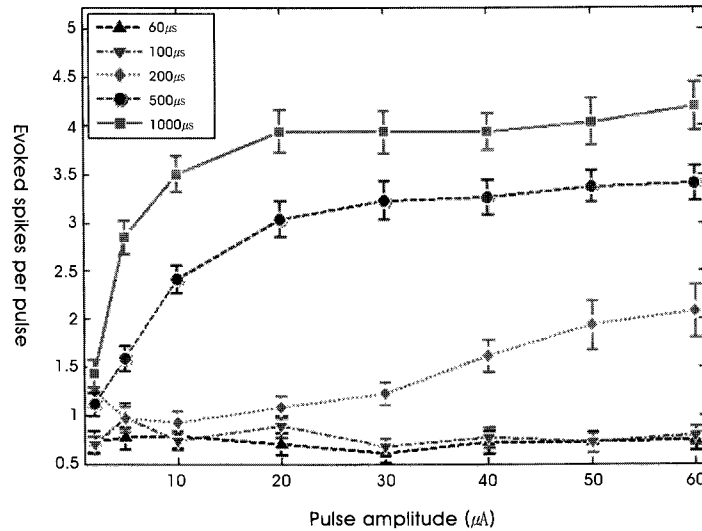


그림 4. 자극펄스의 세기증가에 따른 망막신경절세포 반응 활동전위 수. (각 세기당 20회씩 자극 제시되었으며, 28개의 망막신경절세포의 응답으로부터 얻은 결과)

Fig. 4. The number of evoked RGC spikes as a function of pulse amplitude (obtained from 28 RGCs). 20 pulses were applied for each pulse amplitude.

펄스폭 500과 1000 μs 에서는 자발적인 활동전위와는 뚜렷하게 구분되는 높은 발화율 (firing rate)로 자극에 의해 유발된 반응이 발생하는 것을 확인할 수 있었다 (그림 3 (d), (e)). 또한, 자극에 의해 유발되는 망막신경절세포의 반응이 망막의 자발적인 활동에서 관찰되는 주기적 흥분의 영향을 받아 발생하기 때문에, PSTH에도 약 10 Hz의 주기로 여러 개의 피크가 나타나며, 첫 번째 피크 이후로 그 크기가 점차 감소하는 것이 관찰되었다.

자극에 의해서 유발되는 망막신경절세포의 반응이 자극이 제시된 시점으로부터 약 0~100 ms 이내에서 가장 활발하게 나타나기 때문에, 자극의 세기변화에 따라 0~100 ms이내에서 유발된 반응의 변화를 도시함으로써 분석하였다 (그림 4). 펄스폭 60, 100 μs 에서는 자극펄스의 세기가 증가해도 유발되는 반응이 거의 없음을

다시 한번 확인할 수 있었으며, 펄스폭 200 μs에서는 자극에 의해 유발되는 활동전위의 개수가 2~60 μA까지 서서히 선형적으로 증가하였다. 펄스폭 500, 1000 μs에서는 자극에 응답하여 유발되는 활동전위의 개수가 자극펄스의 세기 증가에 따라 함께 증가하였으며, 특히, 펄스폭 500 μs 일 때와 1000 μs 일 때에는 각각 2~20 μA, 2~10 μA 범위에서 선형적으로 증가하는 것이 관찰되었다.

2) 짧은 반응시간 (latency) 을 갖는 활동전위

본 연구에서 실험했던 동물모델의 망막은 변성망막이지만 망막 신경절세포는 남아있기 때문에 변성망막에서도 짧은 반응시간을 갖는 반응이 나올 것으로 예상하고 펄스 아티팩트 파형을 관찰하였다. 그림 5 (a)와 같이 자극펄스 제시 후 약 2 ms 부근에서 짧은

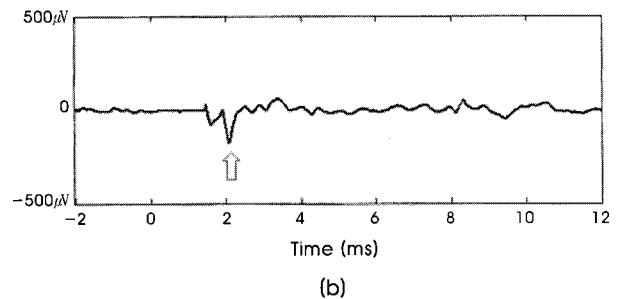
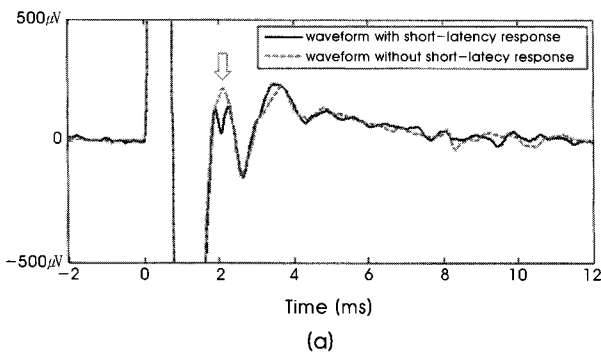


그림 5. (a) 반응시간이 짧은 활동전위와 펄스 아티팩트가 중첩된 파형과 활동전위가 포함되어 있지 않은 파형의 비교. (b) 짧은 반응시간을 갖는 활동전위의 검출을 위하여 template subtraction을 이용하여 두 파형의 차이를 구한 결과. (자극펄스의 세기가 30 μA 일 때)

Fig. 5. (a) Comparison of stimulation artifact waveforms with and without short-latency spike. (b) Recovered short-latency spike waveform obtained from template subtraction (pulse amplitude: 30 μA).

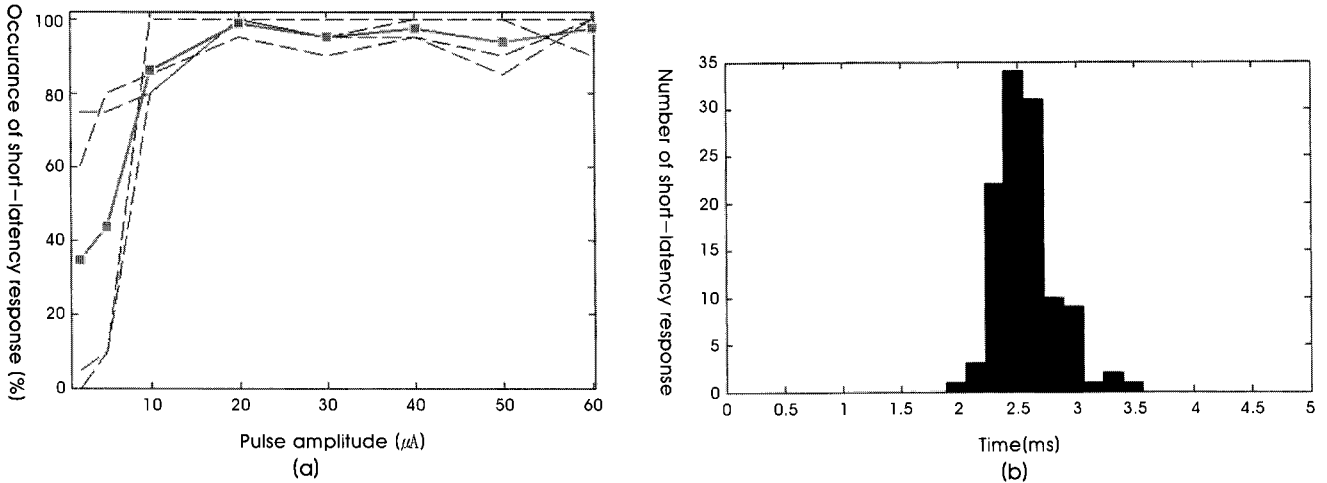


그림 6. (a) 자극의 세기에 따른 짧은 반응시간을 갖는 활동전위 발생확률 (대표적인 4개의 망막신경절세포에서 얻은 결과. 검은선: 망막신경절세포 각각의 결과, 붉은선: 평균), (b) 짧은 반응시간을 갖는 활동전위의 발생시간 분포

Fig. 6. (a) Firing probability of short-latency spikes as a function of pulse amplitude. (b) Distribution of latencies of short-latency spikes

반응시간을 갖는 활동전위가 펄스 아티팩트와 중첩되어 발생하는 것이 관찰되었다. 이와 같은 반응을 관찰하기 위하여 같은 세기의 자극펄스가 제시되었을 때 반응이 나타나지 않은 파형을 템플릿으로 만들어 반응이 나타난 파형과의 차이를 구하여 활동전위를 검출하는 template subtraction 방법을 이용하였다 [12]

관찰결과 반응시간이 짧은 활동전위는 주로 1개의 활동전위로 나타나는데, 자극의 세기 증가에 따라 개수가 증가하지는 않지만, 발생확률이 증가하였으며, 약 30 µA의 세기의 자극이 제시되었을 때에는 거의 100%에 가깝게 발생하였다 (그림 6 (a)). 또한, 그림 6 (b)에서 나타난 것과 같이 주로 자극 펄스가 제시된 후 약 2~3 ms 에서 발생하는 것을 확인할 수 있었다.

IV. 토 의

본 논문에서는 인공시각장치의 최적화된 자극방법을 개발하기 위하여 인공시각장치의 대상이 되는 변성망막의 전기자극에 대한 반응을 분석하였다. 변성망막의 선행연구로서는 이미 자발적인 활동 (spontaneous activity)에 대한 연구[9,10]가 진행되고 있으며, 전기자극에 대한 정상망막과 변성망막에 대한 비교 연구도 진행되고 있다[13]. 그리고, *in-vitro* 조건이 아니라 퇴행성 망막질환으로 인해 시력을 상실한 환자를 대상으로 한 임상실험을 통해, 변성망막에 대한 *in-vivo* 연구도 활발하게 진행 중이다 [4,5].

그러나 다양한 자극조건, 즉, 자극펄스의 세기변화, 자극펄스폭, 자극율, 자극 펄스의 극성 등을 변화 시켜가며 시각정보를 충실하게 전달할 수 있는 자극방법에 대한 연구는 미비한 실정이다. 임상적, 상업적으로 가장 성공한 인공신경기기(neural prosthesis)인 인공와우(cochlear implant)의 경우, 동일한 전극을 환자에게 이식하더라도 입력되는 청각정보를 전기자극의 형태로 변환하는 자

극 방법에 따라, 청력상실환자의 청취율이 달라지기 때문에[14], 인공시각장치에서도 입력되는 시각정보를 전기자극의 형태로 변환하여 충실하게 시각정보를 전달할 수 있는 자극방법의 개발이 반드시 필요하다. 정상망막에 대한 다양한 전기자극을 통해 최적의 자극조건을 결정한 선행연구[8]에 기반하여 본 논문에서는 변성망막에 평판형 다채널 전극을 부착하여 망막 앞을 자극하는 epi-retinal type 인공시각장치의 *in-vitro* 모델을 수립하고, 변성망막의 전기자극에 대한 응답을 조사하였으며, 실험 결과를 통해 변성망막에서도 자극펄스의 세기변화를 통해 자극에 응답하는 망막신경절세포의 반응을 변조할 수 있는 가능성을 확인하였다.

A. 전기자극에 대한 망막신경절세포의 응답

실험에서 사용한 동물모델인 *rd1* 마우스는 유전자 변형으로 인해 망막색소변성과 같은 망막을 가지고 있기 때문에 광수용체층 (photoreceptor layer)이 손상되어 정상망막과는 뚜렷하게 다른 특성을 보이는 것이 확인되었다[9,10]. 하지만, 활동전위를 발생시키는 망막신경절세포는 손상되지 않고 남아있기 때문에, 전기자극을 통해 자극에 응답하는 반응을 관찰하는 것이 가능하였다. 정상망막을 대상으로 한 선행연구에서는 자극 펄스세기를 변조함으로써 자극에 대한 망막신경절세포의 반응 (유발된 활동전위의 개수)을 조절하는 것이 가능하였으며, 다양한 세기 범위에서 변조된 자극에 대한 반응을 관찰함으로써 최적의 펄스세기 변조범위를 결정할 수 있었다[8]. 하지만, 변성망막의 반응특성은 정상망막과는 다르기 때문에 변성망막에 대한 최적의 자극조건을 결정하기 위해, 자극 펄스의 세기범위와 펄스폭을 각각 2~60 µA와 60~1000 µs까지 확장하여 그에 대한 반응을 관찰하였다.

변성망막에서 전기자극에 대한 망막신경절세포의 반응의 가장 큰 특징은 주기적인 응답 (rhythmic firing)을 한다는 것이다. 변성

망막의 자발적인 활동에서 나타나는 주기적 흥분은 전기자극 이후에도 나타나며, 자극에 응답하여 나타나는 망막신경절세포의 반응도 이러한 주기적 흥분의 영향을 받아 나타나는 것이 확인되었다. 이러한 이유로, 정상망막에서는 자극에 응답하는 반응이 PSTH에서 하나의 피크로 나타나는 것에 비해 변성망막에서는 다수의 피크가 주기적으로 나타나게 된다.

변성망막에서는 전기자극에 대해서 정상망막에서 나타나지 않는 주기적인 응답특성이 나타나긴 하지만, 정상망막과 동일하게 자극의 세기 증가에 따라 자극에 의해 유발되는 활동전위의 개수가 함께 증가하는 것이 관찰되었다. 특히, 펄스폭이 500 μ s 이상일 때에, 약 2~20 μ A 범위에서 유발되는 활동전위의 개수가 선형적으로 증가하기 때문에, 자극펄스의 세기변조를 통해 망막신경절세포의 반응을 조절하기에 적합한 범위를 결정할 수 있었다.

출력범위, 즉 자극의 세기에 의해서 조절할 수 있는 활동전위 개수의 범위가 넓을수록 입력되는 빛의 밝기 변화를 높은 정확도로 전달할 수 있을 것으로 기대된다. 본 연구 결과 펄스진폭을 2~20 μ A 범위 내에서 변조함으로써 평균 3개의 범위를 얻을 수 있었다. 개별적으로는 자극에 의해서 활발하게 반응하는 세포, 즉 많은 스파이크를 보이는 세포와 자극에 대해 선형적으로 응답하지만 발생 스파이크 수가 적은 세포가 공존하였다. 인공시각장치에서의 시각 정보 전달은 여러 망막신경절 세포들의 총체적 응답에 의해 이루어지므로 다수의 망막신경절 세포들의 응답을 통하여 시각 정보의 전달이 가능할 것으로 기대된다.

이에 따른 추후 연구로써, 인공시각장치로 입력되는 시각 정보, 특히 빛의 밝기 변화가 자극펄스의 세기변화로 변조되어 전달된다는 가정하에 본 연구에서 확인한 펄스의 세기범위 및 펄스폭에 대한 결과를 다양한 형태로 자극펄스의 세기가 변조된 자극 (temporally-patterned stimulation pulse)에 적용하여 실제로 실험을 통해 결정된 범위 내에서 변조된 자극의 세기변화를 망막신경절세포의 반응이 잘 반영하는지에 대한 확인을 통해 다른 자극조건들도 함께 최적화하고자 한다.

B. 짧은 반응시간을 갖는 망막신경절세포 응답

변성망막의 전기자극에 대한 관찰결과 빠른 반응시간을 갖는 반응 (short-latency response)과 주기적인 리듬을 보이는 느린 반응시간을 갖는 반응 (long-latency response) 등 두 가지 형태의 반응이 확인되었다. 이중 전자는 망막신경절세포의 직접적인 자극에 대한 응답으로 전기자극 직후, 펄스 아티팩트와 함께 기록되기 때문에 검출하기가 어렵다. 정상망막에 대한 연구결과 자극율이 약 10 Hz로 증가할 경우 느린 반응시간을 갖는 반응은 억제되기 때문에 이를 이용한 시각 정보 정보 전달이 어려워질 가능성이 있음이 제시되었다[15]. 반응시간이 짧은 경우 높은 자극율에서도 안정적으로 발생하기 때문에 이러한 문제점이 없어 이를 이용한 인공시각장치 전기자극에 대한 노력이 진행되고 있다[15]. 본 연구에서는 정상망막 뿐만 아니라 변성망막에서도 빠른 반응시간을 갖는

활동전위의 발생을 확인하였으며 이를 기반으로 향후 자극펄스 변조방법 및 충실한 시각 정보 전달을 위한 연구수행을 가능케 하였다.

C. 후속 연구방향

본 논문에서는 인공시각장치에서 전기자극, 특히 자극의 세기변화를 통해 시각 정보를 전달할 수 있다라는 가정을 가지고 실험을 수행하였다. 하지만, 의미있는 시각 정보 전달을 위해서는 하나의 채널이 아닌 다수의 채널에서 동시에 자극을 제시함으로써 다중 픽셀 이미지 (multi pixel image)에 대한 정보를 전달할 수 있는 자극방법의 개발이 반드시 필요하다. 인공와우의 경우 인접한 자극 전극에서 동시에 전기자극을 제시할 경우, 왜곡이 발생하여 자극이 의도한대로 이루어지지 않기 때문에, 각 채널의 자극 펄스가 제시되는 시점 사이에 간격을 두어 자극을 전달하는 CIS(continuous interleaved sampling)와 같은 자극방법이 개발되어 있는데, 인공시각장치의 자극방법 개발에 있어서도 이러한 다른 인공신경기기에서 사용되는 방법들을 응용하여 적용할 수 있어야 할 것이다. 또한, *in-vitro* 환경에서 자극을 제시하고 반응을 관찰하는 실험의 다음 단계로 *in-vivo* 실험을 통해서 망막에서 자극을 주었을 때, 우리 뇌에서 시각 정보를 처리하는 시각피질에서의 관찰되는 신경세포들의 응답을 함께 연구해야만, 실질적으로 인공시각장치에서 사용할 수 있는 효과적인 자극방법의 개발이 가능할 것이다.

참고문헌

- [1] A. Santos, M. S. Humayun, E. de Juan, R. J. Greenburg, M. J. Marsh, I. B. Klock, and A. H. Milam, "Preservation of the inner retinal in retinitis pigmentosa: A morphological analysis," *Arch. Ophthalmol.*, vol. 115, pp.511-515, 1997.
- [2] E. Zrenner, "Will retinal implants restore vision?" *Science*, vol. 295, pp. 1022-1025, 2002.
- [3] L. B. Merabet, J. F. Rizzo, A. Amedi, D. C. Somers, and A. Pascual-Leone, "What blindness can tell us about seeing again: merging neuroplasticity and neuroprosthesis," *Nat. Rev. Neurosci.*, vol. 6, pp. 71-77, 2005.
- [4] M. S. Humayun, E. de Juan, Jr., G. Dangelie, R. J. Greenberg, R. H. Probst, and D. H. Phillips, "Visual perception elicited by electrical stimulation of retina in blind humans," *Arch. Ophthalmol.*, vol. 114, pp. 40-46, 1996.
- [5] M. S. Humayun, J. D. Weiland, G. Y. Fujii, R. Greenberg, R. Williamson, J. Little, B. Mech, V. Cimmarusti, G. V. Boemel, G. Dangelie, and E. de Juan, Jr., "Visual perception in a blind subject with a chronic microelectronic retinal prosthesis," *Vision Res.*, vol. 43, pp. 2573-2581, 2003.
- [6] J. M. Seo, S. J. Kim, H. Chung, E. T. Kim, H. G. Yu, and Y. S. Yu, "Biocompatibility of polyimide microelectrode array for retinal stimulation," *Mater. Sci. Eng., C*, vol. 24, pp. 185-189, 2004.
- [7] L. Hesse, T. Schanze, M. Wilms, and M. Eger, "Implantation of retina stimulation electrodes and recording of electrical stimulation responses in the visual cortex of the cat," *Graef. Arch. Clin. Exp. Ophthalm.*, vol. 238, pp. 840-845, 2000.

- [8] S. B. Ryu, J. H. Ye, J. S. Lee, Y. S. Goo, and K. H. Kim, "Characterization of retinal ganglion cell activities evoked by temporally patterned electrical stimulation for the development of stimulus encoding strategies for retinal implants," *Brain Res.*, In Press. 2009.
- [9] J. H. Ye, and Y. S. Goo, "The slow wave component of retinal activity in rd/rd mice recorded with a multi-electrode array," *Physiol. Meas.*, vol. 28, pp. 1079-1088, 2007.
- [10] S. F. Stasheff, "Emergence of sustained hyperactivity and temporary preservation of OFF responses in ganglion cells of the retinal degeneration(rd1) mouse," *J. Neurophysiol.*, vol. 99, pp. 1408-1421, 2008.
- [11] A. Stett, W. Barth, S. Weiss, H. Haemmerle, and E. Zrenner, "multisite stimulation of the isolated chicken retina," *Vision Res.*, vol. 40, pp. 1785-1795, 2000.
- [12] C. Sekirnjak, P. Hottowy, A. Sher, W. Dabrowski, A. M. Litke, and E. J. Chichilnisky, "Electrical stimulation of mammalian retinal ganglion cells with multielectrode arrays," *J. Neurophysiol.*, vol. 95, pp. 3311-3327, 2006.
- [13] T. M. O'Hearn, S. R. Satta, J. D. Weiland, M. Maia, E. Margalit, and M. S. Humayun, "Electrical stimulation in normal and retinal degeneration (rd1) isolated mouse retina," *Vision Res.*, vol. 46, pp. 3198-3204. 2006.
- [14] P.C. Loizou, "Mimicking the human ear," *Signal Processing Magazine, IEEE*, vol. 15, pp. 101-130, 1998.
- [15] S. I. Fried, H. A. Hsueh, and F. S. Werblin, "A method for generating precise temporal patterns of retinal spiking using prosthetic stimulation," *J. Neurophysiol.*, vol. 95, pp. 970-978, 2006.