

다채널 전극을 이용한 초음파 자극 시 쥐 해마 신경 세포의 활동 전위 검출

한희석¹ · 전현재¹ · 황서영² · 이예나² · 변경민¹ · 전상범^{2,3} · 김태성¹

¹경희대학교 생체의공학과, ²이화여자대학교 전자공학과, ³이화여자대학교 뇌인지과학과

Modulation in Action Potentials of Rat Hippocampal Neurons Measured on Multi-Channel Electrodes During Ultrasound Stimulation

H. S. Han¹, H. J. Jeon¹, S. Y. Hwang², Y. N. Lee², K. M. Byun¹, S. B. Jun^{2,3} and T.-S. Kim¹

¹Department of Biomedical Engineering, Kyung Hee University, Yongin, Korea

²Department of Electronics Engineering, College of Engineering, Ewha Womans University, Seoul, Korea

³Department of Brain and Cognitive Sciences, Ewha Womans University, Seoul, Korea

(Manuscript received 18 July 2013; revised 9 September 2013; accepted 29 November 2013)

Abstract: It is known that ultrasound affects action potentials in neurons, but the underlying principles of ultrasonic neural stimulation are not clearly elucidated yet. In this study, we measured the action potentials of rat hippocampal neurons cultured on multi-electrode arrays during ultrasound stimulation. From most of electrodes, it was observed that the ultrasound stimulation increased the frequencies of action potentials (i.e., spikes) during ultrasound stimulation.

Key words: Transcranial Ultrasound Stimulation, Neuromodulation, Multi-Channel System, Action Potential, Hippocampal Neurons

I. 서 론

신경조율(neuromodulation)은 손상되어 감소된 뇌신경 기능이 재 활성화 되도록 외부 자극을 가하여 조율하는 일종의 신경 재활 기술이다. 최근 들어 신경재활을 위하여, 심뇌자극법(deep brain stimulation), 경두개직류자극법(transcranial direct current stimulation), 경두개자기자극법(transcranial magnetic stimulation) 등의 다양한 방식으로 신경재활 기술이 연구 중에 있다. 하지만 이러한 방

법들은 침습적 방식, 직접적인 전류 주입, 그리고 자극의 낮은 집중도로 인해 재활 치료의 제약이 따르는 한계가 있다. 이러한 한계를 극복하기 위하여 경두개 초음파 자극법(transcranial ultrasound stimulation, TUS)이 연구 중에 있으며, 초음파를 이용한 자극법의 경우 비침습적이며, 고집중도의 신경자극이 가능하다는 장점이 있다[1,2]. 경두개 초음파 자극법은 초음파를 이용하여 신경 조율을 하는 것으로써, 이는 세포 외부에서부터 저주파, 저강도의 초음파(low-intensity, low-frequency ultrasound)의 진동 에너지를 이용하여 신경 세포의 활동성을 변화시키는 세포 자극 방법을 말한다[3]. TUS의 초음파 신경 조율의 기초 원리를 이해하고자 다채널 전극 시스템(multi-electrode array, MEA)를 이용하여, 초음파 자극에 의한 신경 세포의 활동 전위 변화를 관찰하는 연구들이 진행되고 있다.

2008년도에 Khraiche et al.는 다채널 전극 시스템을 이

Corresponding Author : T.-S. Kim
Department of Biomedical Engineering, Kyung Hee University, Yongin, Korea
TEL: +82-31-201-3240 / FAX: +82-31-201-3666
E-mail : tskim@khu.ac.kr

이 논문은 2011년도 정부(교육과학기술부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 연구임(2011-0029485).

용하여 신경 세포에 7.75 MHz의 초음파를 1분간 조사하여 신경 자극 전후를 비교하여 활동 전위의 발생빈도가 증가하는 것을 보였다[4]. 또한, 2009년도에는 Muratore *et al.*는 쥐의 해마영역의 뇌절편을 배양하여 4.04 MHz의 초음파 자극을 1 ms간 조사 하여, 초음파의 강도에 따른 local field potential (LFP)의 크기 증가를 관찰하였으며[5], 해마 조직의 cornu ammonis 1 (CA1) 영역과 dentate gyrus 지역에 각각 4.04 MHz 초음파 자극을 100 ms간 실시하여 다른 영역에서도 유사한 반응 양상을 보였다[6].

이 외에 초음파 자극을 이용한 다양한 신경 자극 연구가 진행되고 있다. Tsui *et al.*는 초음파 자극의 강도 변화에 따른 신경 조직의 열 효과에 대한 실험[7]을 진행하였으며, Ahmadi *et al.*는 인체에 초음파 자극을 실시한 연구들을 정리하여, 초음파의 강도와 주파수에 따른 자극에 대한 반응과 안정성에 연구결과를 발표하였다[8]. Tyler *et al.*는 쥐 뇌에 저주파의 초음파 자극을 주었을 때, 뇌의 M1 지역의 LFP, 다 단위 활성도(multiunit activity)와 다리의 근전도(electromyogram)를 통하여 초음파에 의해 자극 됨을 보였다[9]. King *et al.*은 초음파의 acoustic intensity, duration, stimulus time 등의 특징 별로 쥐-뇌를 자극하여 다리의 근전도를 측정하였으며, 각 특징에 따른 근전도의 반응에 대한 연구결과를 발표하였다[10].

이처럼 다양한 연구가 진행되고 있지만, 신경 세포의 초음파 자극에 반응에 있어서 어떠한 기전을 통하여 활동성이 변하는지를 정확히 밝혀진 바가 아직 없기 때문에 이를 규명하기 위한 다양한 연구가 필요하다[11-13]. 본 연구에서는 초음파 신경조율의 기전 연구를 위한 초기 단계로서, 다채널 전극 시스템을 사용하여 쥐(rat) 뇌의 해마의 신경세포를 배양하여 초음파 자극을 조사 하였을 때, 세포의 활동전위의 변화를 관찰하였다. 그 결과 초음파 자극 강도에 따라, 신경 세포의 활동 전위 발생 빈도가 변화하는 것을 관

찰하고, 초음파 자극에 의한 신경 세포의 활성화를 다채널 전극의 전 채널 활동 전위 개수의 T-test를 통하여 확인하였다.

II. 연구 방법

1. 실험 환경

본 연구에 사용한 세포는 임신 18일이 된 Sprague-Dawley 쥐의 배아에서 추출한 해마를 이용하여 primary neuron을 배양하였으며, 배양액으로는 neurobasal media (NEURO BASAL™ Medium, 21103, GIBCO®, CA), B27 supplement (17504-044, GIBCO®, CA), 2 mM glutamax (35050, GIBCO®, CA), penicillin-streptomycin (15140, GIBCO®, CA)을 사용하였다. 신경세포는 600 cells/mm²의 밀도로 배양하였고, MEA의 온도는 37도 유지 하여 실험을 진행하였으며, bursting activity가 발생하기 않는 배양 7일째에 신경 신호 기록을 수행하였다[14].

신경신호 측정을 위한 다채널 전극으로 투명한 도체(ITO glass)에 TiN를 전극으로 하고 silicon nitride를 절연체로 하는 미세 전극 배열(multi-electrode array, MEA, Reutlingen, Germany)을 사용하였다. MEA의 전극의 수는 60개이며, 신경신호의 기록을 위한 전극의 직경은 30 μm이며 전극 간 거리는 200 μm이다. 세척액(tergazyme, terg-A-Zyme)을 사용하여 세척한 뒤, poly-d-lysine (PDL)으로 전극의 표면을 코팅하여 세포흡착을 원활하게 하였다. 그림 1(a)와 같이 실험 환경을 설정하였다.

초음파 펄서(MKPR-1025, MKC Korea Co., Seoul, Korea)의 중심 주파수는 0.5 MHz로 설정하였고, 초음파 발생 element의 면적이 10 × 10 mm²로 제작한 트랜스듀서(TKS Corp., Busan, Korea)를 사용하였다. 초음파 자극의 pulse repetition frequency (PRF)의 범위는 380~400

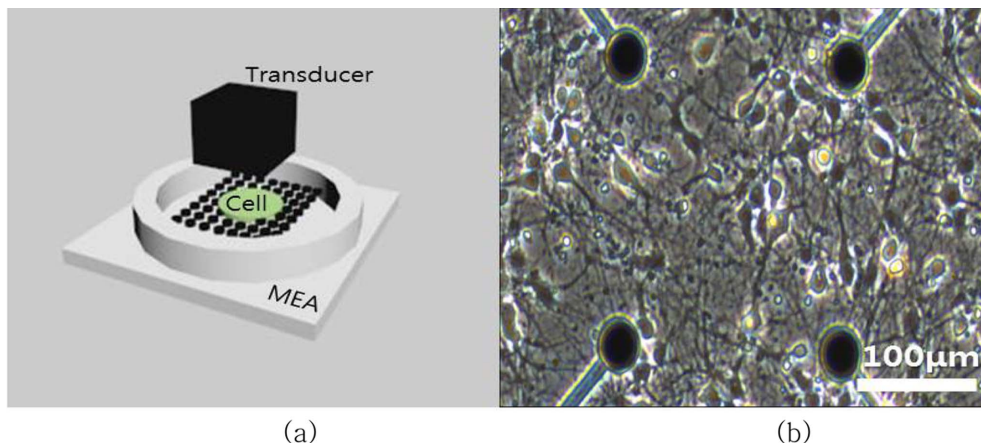


그림 1. (a) MEA 실험 모식도, (b) 다채널 전극에 배양된 해마 세포

Fig. 1. (a) Experimental setup of ultrasound stimulation on MEA, (b) cultured hippocampal neurons on MEA

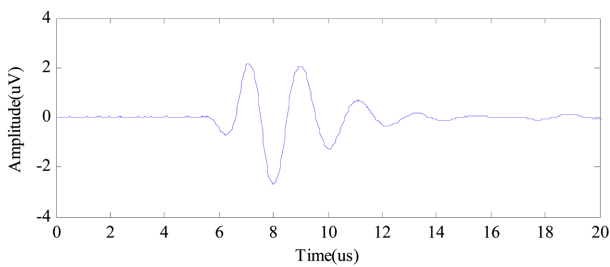


그림 2. 자극에 사용된 초음파 파형

Fig. 2. Ultrasound Waveform used in Stimulation

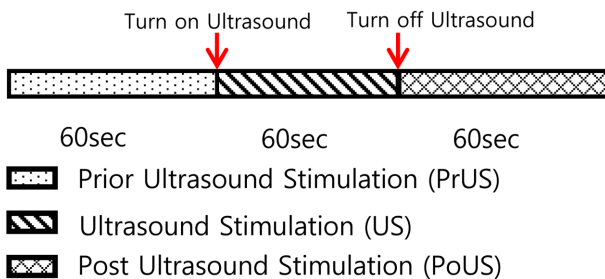


그림 3. 실험 프로토콜

Fig. 3. Experimental Protocol

Hz, pulse duration (PD)은 $2.097 \mu\text{s}$ 를 사용하였고, 초음파 펄스의 spatial-peak pulse-average intensity (I_{SPPA})는 $18.24 \times 10^{-5} \text{ W/cm}^2$, spatial-peak temporal-average intensity (I_{SPTA})는 $98.72 \times 10^{-5} \text{ mW/cm}^2$, maximum pressure는 11.52 KPa 이었다. 초음파 펄스의 강도는 초음파 밀도 측정 시스템(AST01, Onda Corp., Synnyvale, CA, USA)과 하이드로폰 (HGL-0200, Onda Corp., Synnyvale, CA, USA)을 사용하여 측정하였다. 그림 2에 초음파 자극에 사용한 발생 파형을 도시하였다. 그림 3은 본 실험의 프로토콜을 보여주고 있다. 실험의 순서는 대조군으로 초음파 실험환경과 동일하게 하여 자극을 주지 않은 상태로 3분간 실험을 하였으며, 실험군으로 동일한 세포를 사용하여 초음파 자극 전 60초, 초음파 자극을 60초간 실시하였으며, 자극을 끈 상태로 60초로 총 3분간 실험하였으며, 초음파의 자극 강도에 따른 신경 세포 활동 전위의 발생 빈도를 확인하기 위하여, 4개의 다채널 전극 샘플을 대상으로 펄서의 3가지 에너지 레벨에서 실험을 하였고, 각 에너지 레벨의 자극 후, 1시간의 휴지기를 가졌다. 신경 신호는 25 kHz 의 주파수로 샘플링 하였다.

2. 분석 방법

본 논문에서는 MEA에서 획득한 신경 세포의 신호에서 스파이크를 검출 하기 위하여 4차 대역통과 필터를 이용하여 $300 \sim 3000 \text{ Hz}$ 대역의 신호를 분석하였다. 수식 (1)의 역치값을 사용하여 스파이크를 검출하였다[15].

$$\text{Threshold} = 6 * \text{median} \left(\frac{\text{abs}(X)}{0.6745} \right) \quad (1)$$

수식 (1)에서 X는 잡음의 RMS 값이다. 수식 (1)을 통하여 검출된 스파이크를 자극 상태에 따른 활동 전위의 발생 빈도를 알아보기 위하여 잡음 채널을 제외한 57개의 채널에서 초음파 자극 전, 자극 중에서 검출된 스파이크의 빈도수를 이용하여 활동 전위의 변화를 분석하였다.

3. 통계 방법

초음파 자극 전과 자극이 인가되는 동안의 활동 전위 발생 빈도변화의 유의성을 검출하기 위하여 SPSS software (SPSS Statics 21, SPSS, Chicago, IL, USA)를 통하여 통계학적 분석을 실행하였다. 대응 표본 T-검정을 통하여 초음파 자극 전(PrUS)과 자극 중(US)에 검출한 채널에서의 스파이크의 개수의 총합을 비교 하였으며, 도출 된 p값은 0.05보다 작게 나오면 그룹 간의 유의한 차이가 있다고 분석하였다.

III. 결 과

대조군 실험으로 초음파를 인가하기 전 MEA를 통해 측정된 57채널의 Threshold의 평균값(mean $\pm$ SD)은 $-37.59 \pm 7.57 \mu\text{V}$ 이며 이를 통해 획득한 활동전위의 raster plot은 그림 4(a)와 같다. 측정된 3분의 시간이 경과함에 따라 큰 활동전위의 빈도가 변화가 크게 변화하지 않은 것을 볼 수 있다. 반면에 그림 4(b)에는 초음파 자극을 조사하고 있는 60~120초 구간에서 자극 전 보다 스파이크의 발생빈도가 크게 증가하는 경향을 확인 할 수 있으며, 자극을 멈춘 후에는 서서히 빈도가 감소하였다.

그림 5는 한 채널에서 기록된 신경활동전위의 예를 보여 주고 있으며, 초음파 자극을 조사하기 시작한 그림 5(b)의 60초 이후에서 초음파 자극 전의 세포의 활동 전위의 발생 빈도가 변하는 것을 확인 할 수 있다. 또한 초음파 자극을 멈춘 120초 이후에서 세포의 활동 전위가 서서히 감소하는 것을 확인 하였다.

그림 6(a)는 MEA의 측정된 신호에서 검출 된 스파이크를 중첩하여 나타낸 것으로써, 스파이크 형태의 변화가 없는 것을 확인 할 수 있다. 그림 6(b)와 (c)는 서로 다른 채널에서의 자극에 따른 활동 전위의 발생 빈도 비교를 위해 스파이크의 개수를 초음파 자극 전, 중, 후로 나타내고 있다. 그림 6(b)에서의 결과를 살펴보면, PrUS에서는 검출 된 스파이크가 78개, US에서 235개, PoUS에서는 155개의 스파이크가 검출 되었으며, (c)에서는 PrUS에서는 56개, US는 160개, PoUS는 174개가 검출되었다. 이와 같이 초음파 자극에 의한 신경 세포의 활성화가 증가하는 것을 확인하였으

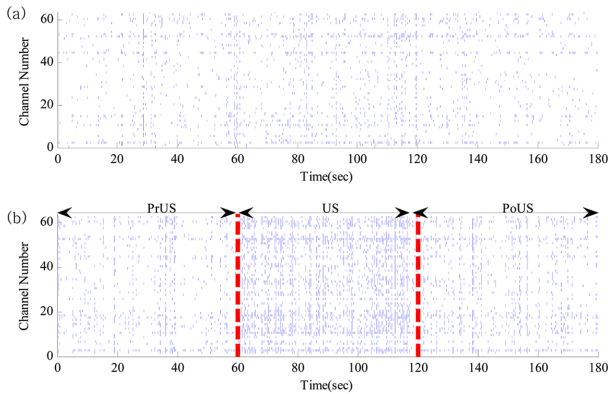


그림 4. MEA에서 측정된 신경활동전위의 raster plot (a) 초음파 자극이 없는 경우(b) 초음파자극(US)이 인가된 경우
Fig. 4. Raster plots of neural spikes recorded with 60 channel MEA (a) No ultrasound stimulation (control), (b) Ultrasound stimulation

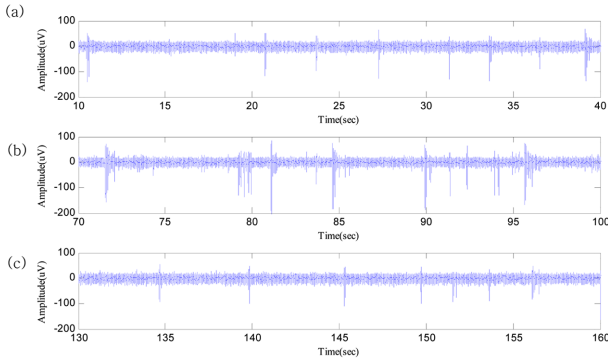


그림 5. 한 채널에서 기록된 신경신호의 raw 파형 초음파 (a) 자극 전 (b) 자극 중 (c) 자극 후
Fig. 5. A raw waveform of neural activity recorded via a MEA (a) before (PrUS), (b) during (US), and (c) after ultrasound stimulation (PoUS)

며, 초음파 자극 후에 스파이크의 빈도가 자극 전의 수준으로 감소하지 않고 활성화를 유지하는 소수의(< 2) 채널이 기록되었으나 대부분의 전극에서는 그림 6(b)와 같이 전반적으로 활성화가 감소하는 경향을 보였다.

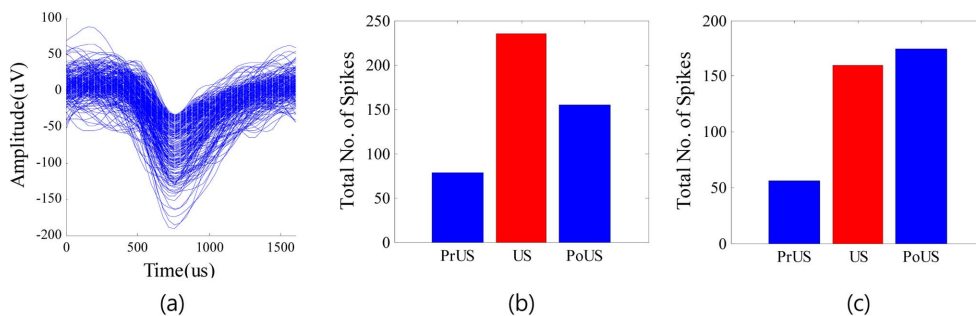


그림 6. (a) 기록된 스파이크의 중첩 파형, (b), (c) 초음파 자극 전(PrUS), 중(US), 후(PoUS)에 기록된 스파이크의 개수 비교
Fig. 6. (a) Overlapped waveforms of detected spikes (b), (c) The numbers of spikes during PrUS, US, and PoUS

표 1. 초음파 자극 전(PrUS)과 중(US) 간의 스파이크 개수의 T-test 검증 결과($P < 0.05$)

Table 1. The result of T-test on the number of spikes between PrUS and US ($P < 0.05$)

	N	Mean	SEM	T-value	p-value
PrUS	57	25.54	5.59	-11.21	3.07E-16
US		67.35	8.18		

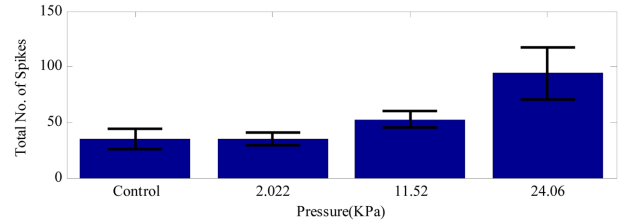


그림 7. 초음파 강도에 따른 신경 세포의 활동 전위의 발생 빈도
Fig. 7. Number of Spikes in response to the intensity of the ultrasound

표 1에서 전 채널($N = 57$)에서의 PrUS와 US 일 때의 스파이크의 발생 빈도 검출에 대한 유의성을 검증한 결과, PrUS의 평균은 25.54 ± 5.59 개, US의 스파이크 평균은 42.17 ± 8.18 개였다. 초음파 자극 전과 자극 중 일 때의 검출된 스파이크 발생 빈도가 유의한 차이가 있었다($T = -11.21$, $P = 3.07E - 16$).

그림 7은 초음파 자극 강도별 신경 세포($N = 4$)의 활동 전위의 발생 빈도를 확인 한 결과, 자극을 주지 않았을 경우 활동 전위의 발생 빈도(mean $\pm$ SEM)가 35.22 ± 9.38 개, 2.02 KPa에서 34.91 ± 6.25 , 11.52 KPa에서 52.58 ± 7.39 , 24.06 KPa에서 93.90 ± 23.78 개로 나타났다.

IV. 결론 및 고찰

본 연구에서는 경두개 초음파자극에 대한 사전 연구로써, 쥐-뇌 해마 신경세포에 초음파 자극에 의한 활동성 변화를 관찰하였다. 세포의 활동성을 측정하는 지표로는 초음파 자

극 전, 중, 후에 발생한 스파이크의 개수를 통하여 비교하였으며 그 결과 초음파 자극에 의한 해마 신경 세포의 스파이크가 증가함을 확인하였다.

전 채널(N = 57)에서 자극 전 보다 자극 중일 경우 스파이크의 발생 빈도가 증가하는 것을 확인 할 수 있었다. 또한, 초음파 자극을 멈춘 후 57개의 채널 중 55개의 채널에서 스파이크의 발생 빈도가 감소하는 양상을 보였으나, 2개의 채널에서는 자극 후에 스파이크의 발생 빈도가 증가한 채로 유지되는 현상을 나타내었다.

또한 초음파 자극 강도를 변화시켜 자극을 주었을 때, 자극의 강도가 높아질수록 활동 전위의 발생 빈도가 증가하는 것을 확인 하였으며, 24.06 KPa에 해당하는 자극을 주었을 때, bursting activity가 발생하는 것을 확인 할 수 있었다.

본 연구를 통하여 초음파를 이용한 세포 자극이 가능함을 볼 수 있었으나, 자극 후 세포의 흥분과 억제 현상을 명확하게 규명 할 수 없었기 때문에, 이를 규명하기 위한 메커니즘 연구가 진행 되어야 한다고 생각되며, 추후 초음파에 의한 세포 자극의 메커니즘이 밝혀졌을 때, 이를 통해 쥐-뇌에 직접적인 초음파 자극을 통하여 실험동물의 행동반응을 조절하기 위한 목적으로 활용될 수 있을 것으로 사료된다.

References

- [1] N. Lipsman, M.L. Schwartz, Y. Huang, L. Lee, T. Sankar, M. Chapman, K. Hynynen, and A.M. Lozano, "MR-guided focused ultrasound thalamotomy for essential tremor: a proof-of-concept study," *Lancet Neurol*, vol. 12, no. 5, pp. 462-468, 2013.
- [2] S. Harmeroff, M. Trakas, C. Duffield, E. Annabi, M.B. Gerace, P. Boyle, A. Lucas, Q. Amos, A. Buadu, and J.J. Badal, "Transcranial Ultrasound (TUS) effect on mental states: A pilot study," *Brain Stimulation*, vol. 6, no. 3, pp. 409-415, 2013.
- [3] W.J. Tyler, "Noninvasive Neuromodulation with Ultrasound? A Continuum Mechanics Hypothesis," *Neuroscientist*, vol. 17, no. 1, pp. 25-36, 2011.
- [4] M.L. Khraiche, W.B. Phillips, N. Jackson, and J. Muthuswamy, "Ultrasound Induced Increase in Excitability of Single Neurons," in *Proc. 30th Annual International IEEE EMBS Conference*, Vancouver, Canada, August, 2008, pp. 4246-4249.
- [5] R. Muratore, J.K. Lamanna, M.R. Lamprecht, and B. Morrison III, "Bioeffects of Low Dose Ultrasound on Neuronal Cell Function," in *Proc. 38th Ultrasonic Industry Association Symposium*, Vancouver, BC Canada, March, 2009, pp. 1-3.
- [6] R. Muratore, J.K. Lamanna, M.R. Lamprecht, and B. Morrison III, "Hippocampal culture stimulus with 4-megahertz ultrasound," in *Proc. 11th International Symposium on Therapeutic Ultrasound*, New York, USA, April, 2011, pp. 254-258.
- [7] P.H. Tsui, S.H. Wang, and C.C. Huang, "In vitro effects of ultrasound with different energies on the conduction properties of neural tissue," *Ultrasonics*, vol. 43, no. 3, pp. 560-565, 2005.
- [8] F. Ahmadi, L.V. McLoughlin, S. Chauhan, and G.T. Haar, "Bio-effects and safety of low-intensity, low-frequency ultrasonic exposure," *Prog Biophys Mol Biol*, vol. 108, no. 3, pp. 119-138, 2012.
- [9] Y. Tufail, A. Matyushov, N. Baldwin, M.L. Tauchmann, A. Yoshihiro, S.I. H. Tilery, and W.J. Tyler, "Transcranial Pulsed Ultrasound Stimulates intact Brain Circuits," *J. Neuron*, vol. 66, no. 3, pp. 681-694, 2010.
- [10] R.L. King, J.R. Brown, W.T. Newsome, and B. Pauly, "Effective Parameters for Ultrasound-Induced In Vivo Neurostimulation," *Ultrasound Med Biol.*, vol. 39, no. 2, pp. 312-331, 2013.
- [11] M. Afadzi, S.P. Strand, E.A. Nilssen, S.E. Masoy, T.F. Johansen, R. Hansen, B.A. Angelsen, C.D.L. Davies, "Mechanisms of the Ultrasound-Mediated Intracellular Delivery of Liposomes and Dextran," *Transactions on Ultrasonics Ferroelectr, and Frequency Control*, vol. 60, no. 1, pp. 21-33, 2013.
- [12] M. Babakhanian, R.E. Fan, A.P. Mulgaonkar, R. Singh, M.O. Culjat, S.M. Danesh, L. Toro, W. Grundfest, and W.P. Mellea, "In-vitro cell system for studying molecular mechanisms of action associated with low intensity focused ultrasound," In: *SPIE BiOS*, International Society for Optics and Photonics, pp. 82140S-82140S-6, 2012.
- [13] N.I. Vykhodtseva, and V.I. Koroleva, "Steady Potential changes and spreading depression in Rat brains produced by focused ultrasound," in *Proc. 5th International Symposium on Therapeutic Ultrasound*, Boston, USA, October, 2005, pp. 59-63.
- [14] A. Novellino, and J.-M. Zaldivar "Recurrence quantification analysis of spontaneous electrophysiological activity during development: characterization of in vitro neuronal networks cultured on multi electrode array chips," *Advances in Artificial Intelligence*, vol. 2010, no. 3, 2010.
- [15] H.L. Chan, M.A. Lin, T. Wu, S.T. Lee, Y.T. Tsai, and P.K. Chao, "Detection of Neuronal Spikes using an Adaptive Threshold based on the max-min spread Sorting Method," *J. Neuroscience Methods*, vol. 172, pp. 112-121, 2008.