

클러스터드 신경 네트워크의 발달과정 상의 활성 및 연결 특성 변화

이형섭^{1*}, 남윤기¹

한국과학기술원 바이오및뇌공학과¹

Activity and connectivity property changes of clustered network during development

Hyungsub Lee^{1*}, Yoonkey Nam¹

Department of Bio and Brain Engineering, KAIST, Korea

*mrmicro@kaist.ac.kr

Abstract

For understanding the relationship between structure and function of neuronal networks in the brain, many methods to construct in-vitro neuronal culture with specific structure have been developed for past decades. Clustered network can be reliably cultured on micro-electrode array (MEA) using micro-patterning of alginate hydrogel. In this study, neuronal networks with cluster structure were cultured, and their electrophysiological signal was recorded to investigate the effect of the structure to function. We observed stable clusters well-aligned on electrodes during culture days and the development of connections between them. Clustered networks showed different activity and burst properties, and they had more and stronger short-ranged connections than randomly distributed networks.

1. 연구 배경

신경 네트워크의 구조와 기능 사이의 관계에 대한 이해는 뇌과학 분야에서 가장 오래된 질문 중에 하나이다. 최근 연구들에 따르면 뇌 안에서 신경 네트워크에는 hub node, rich-club, modular or hierarchical structure와 같은 구조적인 특징이 나타나고, 이런 구조는 기능적 다양성, 외부 환경에 대한 안정성, wiring cost 등에도 영향을 끼친다고 알려져 있다. [1] 네트워크의 다양한 구조에 따른 기능적인 특성의 연구를 위해서 원하는 구조를 디자인하여 reliable하게 만들 수 있는 신경 네트워크 모델이 필요하다.

신경 네트워크의 구조에 의한 기능적 특성 연구를 위해서, 물리적 또는 화학적 방법을 통한 다양한 in-vitro 네트워크 모델이 개발되어왔다. PDMS, hydrogel 등을 이용한 물리적인 barrier와 cell attractive, cell repellent chemical의 patterning을 통한 신경 세포의 위치 조절 또는 신경 돌기 성장 방향 조절을 이용해 원하는 구조를 가진 신경 네트워크를 만드는 방법이 개발되어 왔다. [2] 최근의 연구에서는 alginate hydrogel을 이용해 신경 세포 cluster를 만들고, 특정 시점에 신경 세포의 손상 없이 alginate barrier를 제거하는 것으로 cluster 구조가 서로 연결되도록 하여 clustered 네트워크를 배양할 수 있는 기술을 보고하였다. [3] 이 방법은 발생 초기의 신경 세포들이 원하는 위치에 cluster를 잘 이룰 수 있고, 원하는 시점에 hydrogel을 지워 연결되는 시점을 선택할 수 있어 안정적으로 clustered 네트워크 구조를 만드는데 좋은 방법이다. Micro-electrode array (MEA) 상에 clustered 네트워크를 배양하여, 발달 과정 상에서의 신경 네트워크의 신호를 손상없이 추출할 수 있고, 기능적 분석을 수행 할 수 있다.

이 연구에서는 alginate patterning을 통해서 cluster 구조를 가진 신경 네트워크를 MEA 위에 배양하고, 발달 과정 중에 신경 신호의 측정 및 변화를 관찰하여 기능적 분석을 진행하였다. 발생 초기에서 후기까지 측정된 spike train으로부터 activity, burst, connectivity 특성 분석을 진행하였고, randomly distributed 신경 네트워크와 비교하여 구조적 차이에 따른 신경 네트워크들의 기능적인 차이를 확인 할 수 있었다.

2. 연구 방법

PDL 코팅된 MEA 상에 200 μm 간격과 100 μm 지름의 원형 패턴을 가진 alginate hydrogel을 전극과 정렬하여 미세패터닝 하였다. 그 위에 E18 SD rat으로부터 채취한 hippocampus로 dissociated primary culture를 진행하면, alginate pattern상에는 신경 세포가 안착하지 못하고, 원형 패턴 안에만 안착하여 cluster를 이루게 된다. 이후 3, 10 DIV에 Na_2CO_3 용액을 이용해 hydrogel의 구조 유지에 영향을 끼치는 칼슘 이온을 제거해주면 alginate hydrogel을 지울 수 있고, neuron cluster들이 neurite를 뻗어 서로 연결될 수 있게 하였다. 배양된 신경 네트워크는 incubator에서 37 $^{\circ}\text{C}$, 5 % CO_2 를 유지하여 보관하였고, 일주일에 2번 media의 절반을 갈아주어 신경 네트워크의 viability를 유지시켜주었다.

신경 네트워크가 성장하는 과정 안에서 기능적인 측정을 위해서, incubator 내부에 설치된 앰프를 통해서 spontaneous neuronal activity를 측정하였다. 신호 측정은 36.5 $^{\circ}\text{C}$, 5 % CO_2 환경에서, 30분의 안정화와 1시간 이상의 연속 측정으로 진행되었다. 측정된 신호는 2nd order butterworth filter로 200 Hz에서 high-pass filtering되어 노이즈를 제거하였고, thermal noise의 SD의 6배를 threshold로 spike를 추출하였다. 측정된 spike train으로부터 기본 activity 특성 분석뿐만 아니라 burst를 측정하였고, cross-correlation 기반의 연결도 측정을 통해서 특성 분석을 진행하였다.

신경 신호는 7 DIV에서 최대 38 DIV까지 측정되었고, random group (R), 10 DIV에 alginate를 제거한 group (A10), 3 DIV에 alginate를 제거한 group (A3)에 대해서 각각 5, 7, 3개의 sample을 이용해서 분석에 사용되었다.

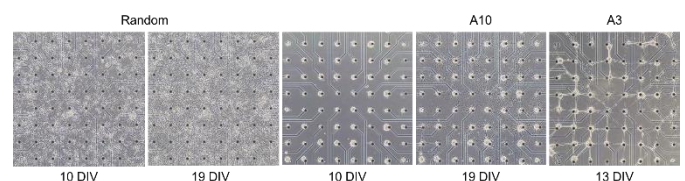


그림 1. Random, A10, A3 group 신경 네트워크의 모습

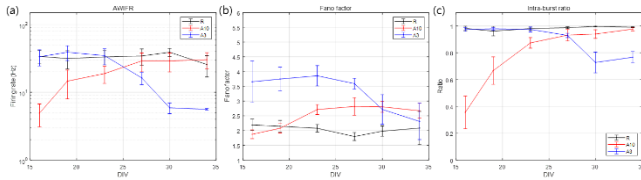


그림 2. 실험 group, DIV에 따른 array-wide instantaneous firing rate(AWIFR), Fano factor, intra-burst ratio의 변화

3. 연구 결과

Alginate clustered network는 MEA의 전극 위에 잘 정렬되어 cluster를 이루는 것을 확인 할 수 있었다. (그림 1) Alginate를 지운 이후에는 cluster로부터 neurite가 자라나와서 서로 연결되어서 network를 이루어가는 과정을 관찰할 수 있었다. A10 group에 비해서 A3 group은 먼저 fasciculation된 neurite bundle을 이루는 모습을 보이고 있었고, A10, A3 group 모두 R group과 비교해서 확실히 cluster 구조를 이루고 있었고, cluster들이 MEA의 전극 위에서 위치를 유지하고 있었다.

R group의 경우는 16 DIV에서 34 DIV까지 높은 수준의 AWIFR를 일정하게 유지하는 모습을 보인 반면에, A10의 경우는 점차 증가하여 R과 비슷한 수준까지 도달 하는 모습을 확인할 수 있었다. A3는 높은 수준을 유지하다가 다른 group들과는 반대로 활성도가 점차 떨어졌다. (그림 2. a) Fano factor는 모든 그룹에서 1보다 훨씬 큰 값을 유지하는 것으로 보아 activity의 양상이 Poisson process과는 다른 pattern을 가진 것을 확인할 수 있었다. (그림 2. b) Burst detection을 통해서 확인한 intra-burst ratio에서는 R group이 처음부터 대부분의 spike가 burst 내부에서 발생한 것에 비해서 A10의 경우는 점차 burst에 참여하는 spike의 비율이 많아졌다. A3는 AWIFR가 떨어지면서 intra-burst ratio도 함께 감소하였다. (그림 2. c) 이런 정량을 통해서 알 수 있는 것은

Cross-correlation 기반으로 spike train 사이의 pair-wise connectivity를 정량하여 group에 따른 연결도 특성을 알아보았다. 전체 가능한 연결도의 개수 대비 실제로 측정된 연결도의 비율을 나타내는 connection density를 살펴보면, R group에서는 발생 초기부터 후반에 이르기까지 거의 1에 이르는 값을 보이고 있었던 반면에 A10은 초반에는 낮은 비율의 connection density에서 점차 높아지는 것을 관찰 할 수 있다. (그림 3. a) 거리와 connection latency 사이의 관계를 linear regression하여 얻은 connection latency의 변화율을 살펴보면, R group의 경우 발생이 진행됨에 따라서 점차 감소하여, 거리가 멀리 떨어진 connection의 경우에도 짧은 latency를 이루고 있었다. 반면에 A10 group의 경우에는 R group에 비해서 훨씬 큰 latency 변화율을 보여주고 있어, 두 실험 group 사이에서의 연결도 특성의 차이를 확인할 수 있었다. (그림 3. b) 모든 전극 사이의 연결이 유효한 연결로 측정될 경우, 전극 간격으로 3칸 이하의 짧은 연결은 약 0.31에 해당하는 비율로 나타나게 되는데, 이를 기준으로 각 group에서 나타나는 짧은 연결이 차지하는 비율의 DIV에 따른 변화를 알아보았다. R group의 경우, 발생 초기에서부터 기준에 해당하는 비율의 짧은 연결이 나타난 반면에, A group은 그에 비해서 훨씬 큰 비율의 분포를 나타내고 있었다. (그림 3. c) 이런 양상은 연결도의 세기의 분포에서도 나타났는데, R group에서 나타난 짧은 연결의 세기의 비율은 기준값에 비해서 크게 나타났지만 A group의 경우에는 그보다 훨씬 더 크게

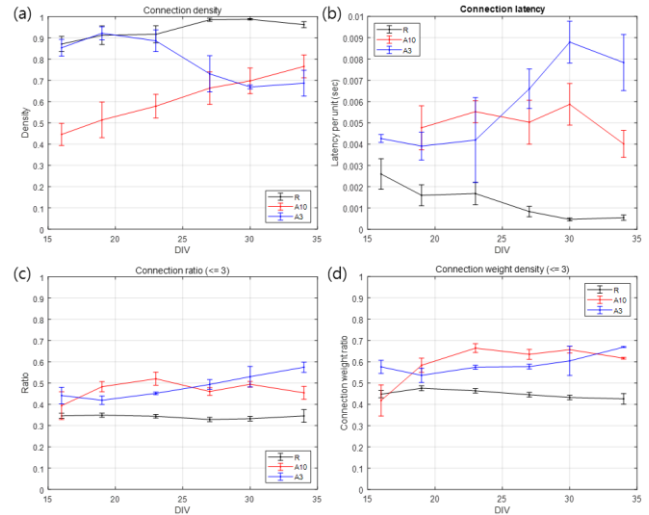


그림 3. 실험 group, DIV에 따른 connection density, connection latency, 짧은 connectivity의 비율, 세기 비율의 변화

나타났다. (그림 4. d) R group에서 연결도는 가능한 대부분의 연결이 나타나면서 짧은 연결 비율이 기준값에 유사하게 나타났지만, A10 group의 연결도는 다소 낮은 비율로 나타나면서 짧은 연결의 비율과 세기의 비율이 모두 높아 서로 가까운 cluster가 우선적으로 연결되는 특성을 나타냈다.

Clustered 네트워크와 같이 구조적인 특성을 가진 신경 네트워크를 alginate hydrogel을 이용하여 MEA 상에 reliable하게 배양하고, 그들의 신경 신호를 발생 과정 안에서 측정할 수 있었다. Clustered 네트워크는 random하게 분포된 network와 activity 특성 및 burst 특성이 다르게 나타났고, 연결도 특성에서는 거리가 짧은 연결이 더 많이 더 강하게 나타나, 가까운 cluster가 우선적으로 연결되는 특성을 나타내었다.

4. Acknowledgements

이 연구는 National Research Foundation of Korea (NRF) 과제의 지원을 받아 수행하였음. (NRF-2021R1A2B5B03001764)

5.참고 문헌

- [1] Sporns O, Betzel RF. Modular Brain Networks. *Annu Rev Psychol.* 2016; 67:613-40, (2015)
- [2] Yamamoto, H., Moriya, S., Ide, K., Hayakawa, T., Akima, H., Sato, S., Kubota, S., Tanii, T., Niwano, M., Teller, S., Soriano, J., & Hirano-Iwata, A. Impact of modular organization on dynamical richness in cortical networks, *Science Advances*, (2018)
- [3] Joo, S., Song, S. Y., Nam, Y. S., & Nam, Y. Stimuli-responsive neuronal networking via removable alginate masks. *Advanced Biosystems*, (2018)