

망막 신경절 세포층에 국소 초음파를 통한 금나노입자 전달에 대한 이광자 현미경을 이용한 분석

박영훈^{1*}, 박준원², 신재우², 장원석², 엄경식¹
부산대학교 전자공학과¹ 연세대학교 신경외과²

Analysis using a Two-photon Microscope for Delivery of Gold Nanoparticles by Focused Ultrasound to the Retinal Ganglion Cell layer

Younghoon Park^{1*}, Junwon Park², Jaewoo Shin², Wonseok Chang², Kyungsik Eom¹
Department of Electronics engineering, Pusan National University, Korea¹
Department of Neurosurgery, Yonsei University college of Medicine²
*yhunp93@gmail.com

Abstract

Safe delivery of gold nanoparticles to the retinal ganglion cell layer is essential in developing the plasmonic retinal prosthesis for the blinds. Focused ultrasound(“FUS”)-assisted gold nanoparticle(“AuNP”) delivery to the retinal ganglion cell layer was verified by imaging their distribution in the retinal tissue using a two-photon microscope. All gold nanoparticles (10nm, 55nm, 40x80nm) injected into mice showed two-photon luminescence in the retinal ganglion cell layer only in FUS sonicated retinas, with no signal observed in FUS-free retinas. Moreover, TPL spectrum was compared with that of retinal tissue and gold nanoparticles to confirm the origin of collected TPL signal. AuNP placed on the retina shows the result of passing through the blood-retina barrier(“BRB”) via FUS and it suggested the delivery of gold nanoparticles to retinal ganglion cell layer via focused ultrasound shined the light on developing plasmonic gold nanoparticle-based retinal prosthesis.

1. 연구 배경

황반 변성, 망막색소변성증, 스타르가르트과 같은 안질환을 겪는 환자의 수가 급격히 증가하고 있으며, 이러한 퇴행성 망막 질환은 광수용체(Photoreceptor)를 손상시키고 실명을 유발한다. 시력 손상 환자를 치료하기 위한 망막 신경절 세포(Retinal Ganglion Cell) 자극을 통한 인공시각 장치가 있으며, 금나노입자 기반의 광학적 인공시각 장치가 새로운 시각 보철물로 제안되고 있다.[1] 그러나 금나노입자를 이용한 광인공시각장치 개발을 위해서는 망막신경절 세포층에 나노물질을 비침습적으로 안전하게 전달하는 선행 연구가 필수적이다.

망막신경절세포에 나노물질을 전달하는 방법으로는 밖으로 노출된 안구의 전반부를 통해서 유리체내에 나노물질을 주사하여 내경계막(Inner Membrane Layer)을 통과하는 방법이 있지만, 안구에 직접 주사가 필요한 침습적이라는 단점을 가진다. 정맥 주사로 나노물질을 전달하는 비침습적인 방법이 제안되지만, 주입된 나노물질은 망막 혈관의 내피와 망막 색소 상피 사이의 복잡한 고체 접합에 의해 형성된 벽인 혈액-망막 장벽(Blood Retina Barrier) 때문에 주입된 나노물질은 장벽을 넘지 못하고 혈관에 갇히게 된다.

혈액-망막 장벽을 투과하여 나노물질을 망막 신경절 세포층에 전달하기 위하여 국소 초음파와 마이크로버블(Microbubble)이 제안된다. 뇌에 존재하는 혈액-뇌 장벽(Blood Brain Barrier) 또한 정맥 주사된 나노물질이 뇌에 전달되지 못하도록 방해한다. 마이크로버블을 나노물질과 함께 주입한 뒤 국소초음파에 조사하는 경우, 마이크로버블이 기계적으로 혈관 벽과 세포막에 일시적인 기공(transient pore)을 생성하여 나노물질에 대한 투과성을 증가시킨다.[2] 이와 같은 방법으로 국소초음파를 망막에 조사하여 정맥 주사된 나노물질이 혈관-망막 장벽을

통과하여 망막신경절세포층에 전달을 가능하게 한다.

하지만, 망막신경절 세포층에 국소 초음파를 이용하여 전달하고자하는 금나노입자는 유기물질이 아닌 금속물질이므로 추가 검증이 필요하며, 이에 물질 전달 여부를 이광자현미경(two-photon microscope)을 이용하여 검증한다. 공초점현미경(confocal microscope)을 이용하여 금나노입자의 형광(fluorescence) 또는 표면 플라즈몬 공명 산란광(SPR scattering light)을 관찰하는 방법이 있지만, 망막의 자가형광 autofluorescence)로 인한 신호간의 간섭이 망막에 주입된 금나노입자의 신호 구분을 불가능하게 하며, 이를 극복하기 위해 이광자 현미경(two-photon microscopy)을 이용하여 망막에 전달된 금나노입자의 이광자 형광(Two-Photon Luminescence)를 측정한다. 이와 더불어, 측정된 신호의 방출 스펙트럼(Emission Spectrum)을 파악하여 측정된 신호가 금나노입자 신호임을 검증한다.[3]

2. 연구 방법

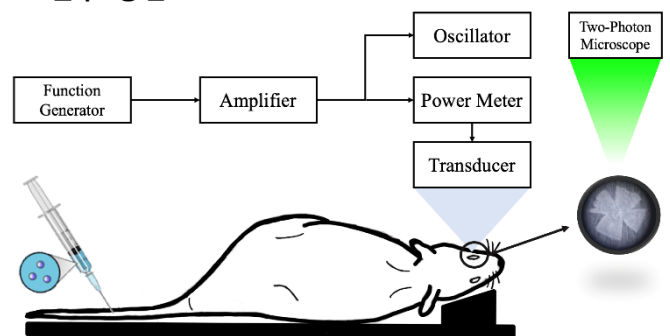


그림 1 Schematic diagram of the experiment: Intravenous injection of gold nanoparticles, focused ultrasound system, two-photon microscopy retinal image.

시력 회복을 위한 국소초음파를 이용한 나노물질 전달은 금나노입자 주입, 국소 초음파 조사, 조직준비, 이광자 현미경 이미징의 순으로 진행된다. 먼저, 크기가 다른 두 종류의 나노스피어(10nm,55nm)와 나노로드(40x80nm)를 마이크로버블과 함께 복강 마취된 마우스(C57BL/6)에 같은 농도(0.2mg/30g)으로 꼬리 정맥에 주사한다. 이후 마우스 안구 한쪽 눈의 각막에 집속 초음파 변환기를 부착하고 망막에 120초 동안 0.3MPa의 세기로 국소초음파를 조사한다. 이광자 현미경 촬영을 위해 초음파가 조사된 눈을 적출한 뒤, 망막을 분리하여 평평하게 펼쳐 이미징을 위한 샘플을 준비한다. 이광자 현미경 이미징(Carl Zeiss, LSM780)은 광학현미경(bright field imaging)을 통해 망막신경절세포층의 위치에 맞추어 z축을 설정한 뒤, xy축을 스캐닝하여 금나노입자의 이광자 형광신호(excitation wavelength of 10nm & 55nm: 720 [nm], excitation wavelength of 40x80nm : 750[nm])를 기록한다. 마지막으로 이광자 현미경을 통해 방출스펙트럼(emission wavelength : 415-656 [nm])을 파악하여, 측정된 형광신호가 금나노입자의 신호임을 확인한다.(그림1)

3. 연구 결과

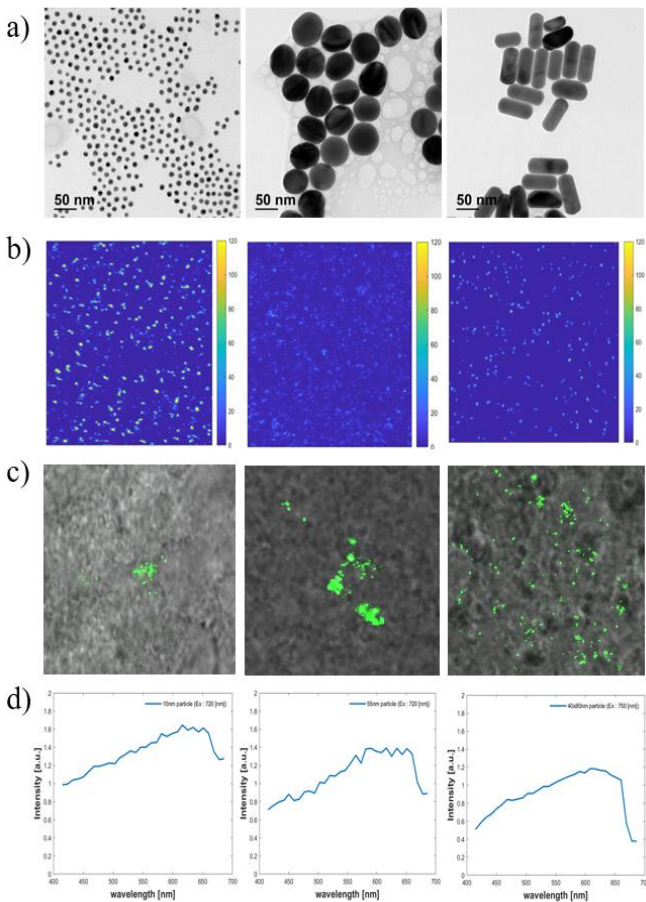


그림 2 (a) TEM image, (b) TPL of only nanoparticle, (c)Two-photon image('Green') and bright field image('background') of retina, (d) Emission spectrum of TPL, (1st column: 10nm gold nanosphere, 2nd column 55nm gold nanosphere, 3rd column : 40x80nm gold nanorod)

<TEM,Transmission Electron Microscope>

투과 전자 현미경을 이용하여, 금나노입자의 물리적 크기를 파악한다. 그림2의 a는 주입한 금나노입자의 TEM

이미지이며, 왼쪽부터 10nm,55nm,40x80nm 금나노입자의 크기를 확인할 수 있다.

<TPL of only particle>

초순수에 희석된 금나노입자를 이광자 현미경을 이용하여 촬영함으로써 이광자 현미경을 이용하여 금나노입자 촬영이 가능함을 확인한다. 그림2(b)를 통해 (왼쪽부터) 10nm,55nm,40x80nm 금나노입자의 이광자형광이 측정됨을 확인할 수 있다.

<TPL and Bright field image>

망막 신경절 세포층에 전달된 금나노입자를 확인하기 위해서, bright field image와 이광자 형광 신호 이미지를 동시에 확인한다. 그림2.c의 배경은 망막의 Bright field image이며, 직경이 약 10 μm인 구형 세포가 확인됨을 통하여 망막 신경절 세포층임을 확인한다. 측정된 초록색 신호는 금나노입자의 이광자 형광 신호이며, 이는 국소초음파를 맞은 실험군의 망막에서만 금나노입자가 관찰된다

<Emission wavelength spectrum>

이광자 현미경을 이용하여 측정된 신호의 방출스펙트럼을 측정할 수 있으며, 이를 통해 금나노입자의 이광자 형광 신호가 아닌 망막의 자가형광 또는 노이즈 신호를 구별한다. 그림2.d는 측정된 금나노입자의 이광자형광신호의 방출스펙트럼을 기록한 데이터이며, 장파장에서 최고점의 빛세기를 가지며, 단파장으로 갈수록 신호의 세기가 감소하는 스펙트럼을 관찰할 수 있다. 이는 금나노입자의 특이 방출스펙트럼으로 측정된 신호가 금나노입자의 신호임을 검증한다.

망막신경절 세포층에서 관찰된 금나노입자의 이광자형광신호를 통해 국소초음파가 정맥 주사된 금나노입자가 혈액-망막 장벽(BRB)를 투과하여 망막신경절 세포층에 전달되었음을 검증하였으며, 이를 통해 더욱 안전한 나노 입자를 이용한 광학적 인공시각장치 개발에 기여할 수 있을 것으로 기대한다.

4. Acknowledgements

이 성과는 2020년도 정부(과학기술정보통신부)의 재원으로 한국연구재단 (MSIT) (2020R1C1C1010505)과 BK21PLUS, 4차 산업혁명 ICT융합을 위한 창의적 인재 교육 및 연구프로그램의 지원을 받아 수행하였음.

5.참고 문헌

- [1] Eom, K.; Kim, J.; Choi, J.M.; Kang, T.; Chang, J.W.; Byun, K.M.; Jun, S.B.; Kim, S.J. Enhanced Infrared Neural Stimulation using Localized Surface Plasmon Resonance of Gold Nanorods. *Small* 2014, 10, 3853-3857.
- [2] Shin, Jaewoo, et al. "Focused ultrasound-mediated noninvasive blood-brain barrier modulation: Preclinical examination of efficacy and safety in various sonication parameters." *Neurosurgical Focus* 44.2 (2018): E15.
- [3] D. Wang, F. Hsu, and C. Lin, "Surface plasmon effects on two photon luminescence of gold nanorods," *Opt. Express* 17, 11350-11359 (2009).