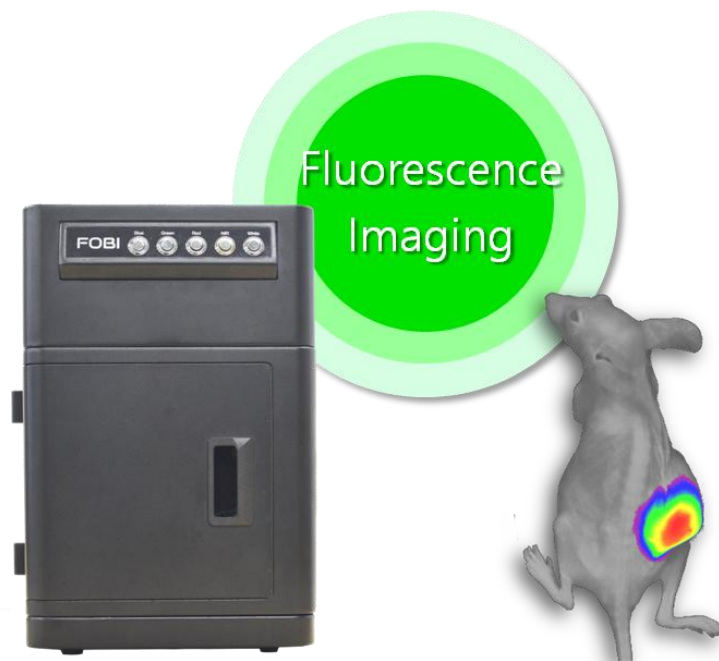


Applications of FOBI



1. Tumorization

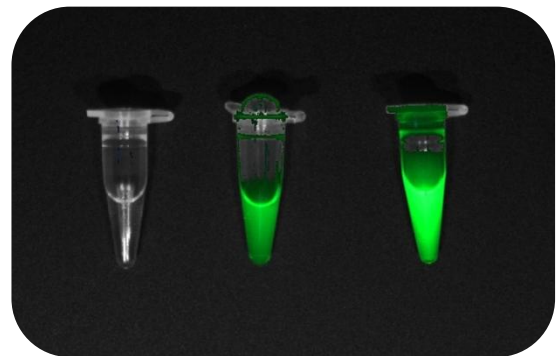
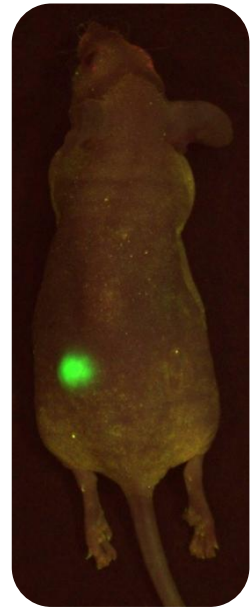
종양은 In Vivo Imaging의 첫 번째 application이다. 기존의 전통적으로 해오던 종양의 sizing은 객관성이 떨어지고 그 근거를 밝히기가 어려운 면이 많았다. 종양을 분리하는 수술을 하고 자로 재고 무게를 재는 방식은 지극히 실험자 위주의 data를 만들기에 충분하다.

Fluorescence imaging은 이러한 주관적 실험을 객관적으로 만들어주는 훌륭한 방법이다. Tumor cell에 Fluorescence gene을 삽입하여 stable cell line을 만들어 사용함으로써 Tumorization 과정을 영상으로 남기고, 그 영상을 분석함으로써 정량데이터를 얻을 수 있다.

Fluorescence gene을 tumor cell에 넣는 방법은 Lenti-virus를 이용하는 것이 가장 효과적이다. Plasmid나 다른 virus를 사용할 수도 있지만, 형광유전자가 cell 내에서 유지되는 정도가 Lenti-virus처럼 강력한 것이 없다. 그리고 형광은 100% 발현되는 cell line을 구축하여야 하며, 형광발현이 없는 cell 이 섞여 있을 때에는 형광이 없는 cell의 분열속도가 빨라서 전체적인 형광발현의 정도가 점점 줄어들게 된다.

In Vivo Imaging은 In Vitro와는 달라서 형광의 발현이 강력해야 한다. 따라서 보통 GFP를 사용하는 것 보다는 최소한 eGFP를 사용해야 하며, cop-GFP 또는 Turbo-GFP를 사용할 것을 권장한다.

Cell이 만들어졌으면 형광의 발현을 형광현미경으로도 확인해야 하지만, FOBI로도 영상을 얻어서 발현 정도를 확인하여야 한다. 형광현미경에서는 강하게 발현하는 것처럼 보일 수 있으나 cell을 띄워서 microtube 상에 옮겨 FOBI에서 확인하였을 때 일정 수준 발현하지 않으면 In Vivo에서 형광을 확인하기



는 어렵다.

In Vivo 실험은 Subcutaneous 실험부터 진행한다. Tumor의 target 조직은 다양하겠지만, 피하에서 항암효과를 먼저 확인한 후에 target조직에서 다시 한번 확인하는 것이 좋다. 실제 target조직에서 항암효과를 확인하는 것이 최종 목표이지만 실 target조직에서의 항암효과 실험은 실험적 변수가 많다. 또한 피하 이상 조직 속으로 형광이 들어갔을 때 광학적인 변수도 많이 존재한다. 실험적, 광학적 변수가 적은 피하에서의 항암효과를 확인하고 (항암효과가 확인되면) target조직에서의 항암효과를 확인하는 것이 좋다.

FOBI로 얻어진 영상은 ROI를 지정하고 intensity값을 읽어 정량 할 수 있다. 정량은 ROI 의 면적 (pixel의 개수) 과 그 ROI 에서 얻어진 intensity값을 곱한 값, integrated density를 사용하여야 한다. 생체 내에서 나오는 형광의 양은 면적 또는 intensity만을 가지고 측정할 수 없다. 두 값을 같이 반영시키기 위해서 두 값을 곱해야 한다.

2. Stem cell tracking

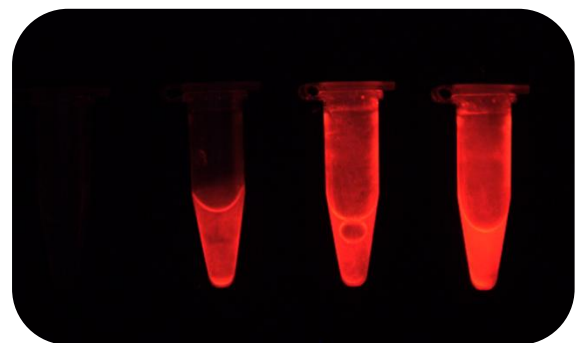
영상을 통해서 In Vivo 실험을 하고자 하는 분야는 tumor에서 시작되었지만, 최근 stem cell 분야에서 그 수요가 늘고 있다. 그 원인은 cell therapy에 대한 관심과 연구가 급증하였기 때문이다. 또한 stem cell 과 tumor를 동시에 확인하는 실험, stem cell과 drug을 동시에 확인하는 실험이 늘어나고 있다.

Stem cell은 tumor와 달리 형광유전자를 cell내에 삽입하기 어렵다. 실험적으로도 어렵지만, 외래 유전자를 stem cell에 삽입하였을 때 stem cell의 특성이 변할 수도 있기 때문이다. Stem cell은 다양한 cell로 분화할 수 있는 능력을 가지고 있는 것이 특징인데, 외래 유전자를 삽입하는 실험과정에서 그 능력을 상실하는 경우가 많다. 따라서 stem cell에 형광을 입힐 경우에는 물리·화학적 염색방법을 택하는 경우가 많다.

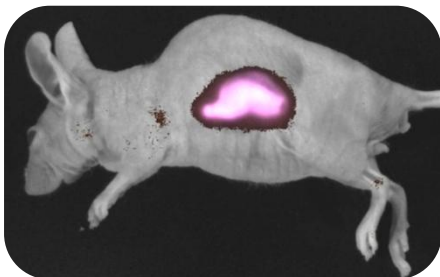
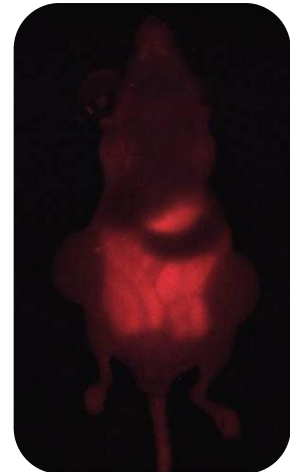
물리·화학적 염색방법도 문제가 없는 것은 아니다. 형광 particle을 cell 내에 넣을 경우도 stem cell의 특성을 변화시킬 가능성이 존재하며, 화학적 방법으로 염색을 할 경우에도 독성이 존재할 수 있다. 하지만, stem cell 종류에 따라서 부작용이 적은 염색 방법이 있다. 각 cell에 맞는 염색법을 통해서 염색을 하고 In Vivo 실험을 적용할 수 있다.

Stem cell 실험도 tumor 실험과 마찬가지로 In Vitro에서 cell을 염색한 후에 FOBI로 염색의 정도를 확인하여야 한다. In Vivo에서 영상이 잘 보이지 않을 경우 그 원인을 파악하기 위해서 injection전에 microtube상에서 확인하는 과정이 반드시 필요하다.

Stem cell의 경우 cell의 양이 많지 않기 때문에 형광 효율이 굉장히 중요하다. 여



기서 고려되어야 하는 것이 형광의 밝기와 조직투과도 그리고 동물의 피부에 존재하는 자가형광이다. 자가형광은 녹색계열과 빨간색계열의 파장에서 많이 발생한다. 영상을 얻은 후 자가형광을 제거하는 방법도 있지만, 그보다는 자가형광이 적은 파장의 형광을 사용하는 것이 유용하다. 따라서 최근 NIR 파장이 주목 받고 있다. FOBI는 Red(630nm)로 excitation해서 725nm 이상 detection하는 Red채널과 NIR(730nm)로 excitation해서 825nm 이상 detection하는 NIR채널 두 가지가 가능하다.



Red채널의 경우 skin에서 나오는 자가형광은 많이 줄어들지만, 먹이에서 유래된 자가형광이 강해서, 위와 장에서 자가형광이 보인다. 그래서 실험동물을 굶기는 방법으로 자가형광을 줄이기도 한다. NIR채널은 skin에서 유래된 자가형광도 없고, 먹이에서 유래된 자가형광도 적다. 하지만, 이 영역에 해당하는 형광물질의 빛의 밝기가 약하고, 카메라의 효율도 Red채널에 비해서 떨어지는 상황이다. 그렇기 때문에 pretest를 통해서 각 실험실에 맞는 형광물질을 찾아 세포 염색에 사용하여야 한다. FOBI로 영상을 얻을 경우 Red 채널의 signal은 빨간색으로 보이고, NIR채널의 signal은 보라색으로 보인다.

염색된 줄기세포를 In Vivo 에서 관찰할 때, 피부 표면에 가까울수록 잘 보인다. 간, 장, 뇌 와 같이 피부 표면에 가깝거나 장애요소가 없는 경우에 영상을 쉽게 얻을 수 있다. 하지만, 피부에서 멀어질수록 영상을 얻기가 어려운데, 같은 간이라도 피부로부터 멀리 떨어져 있는 영역의 영상은 얻기 어렵다. 특히, 폐나 심장과 같이 피부로부터 멀리 떨어져 있을 뿐만 아니라, 풍부한 근육, 여러 가지 막, 지질 등이 여러 층에 의해서 섞여 있는 경우 빛의 투과에 영향을 많이 받기



때문에 영상을 얻기 어렵다. 이러한 경우는 실험이 끝나는 시점에 가슴을 열고 영상을 얻어야 한다. 또는 해부를 해서 Ex Vivo로 영상을 얻는 것도 좋은 방법이다.

3. DDS

Stem cell 만큼이나 큰 관심을 모으고 있는 분야가 drug delivery system이다. 원하는 drug이 원하는 target조직으로 이동하는지 여부를 확인하는 일은 굉장히 중요하면서도 어려운 일이다. Drug에 형광물질을 붙여서 형광을 tracking하는 방법이 DDS연구에 큰 도움을 주고 있다.

DDS는 두 가지 관점에서의 영상이 관심을 모으고 있다. 첫 번째는 'Injection 한 drug이 체내에 언제 어떻게 퍼져 나가는지?' 두 번째는 'Injection한 drug이 target조직으로 언제 어떻게 모이는지?' 이다.



첫 번째 영상은 몸에 얼마나 퍼져 있는지, 즉 형광물질이 혈액에 얼마나 존재하는지 이다. 이 경우, 영상에 나타나는 형광물질이 온 몸에서 나타나는 형광이라고 착각하기 쉽다. 하지만, 실제로는 피부에 존재하는 모세혈관과, 모세혈관을 빠져 나와 피부에 안착된 형광물질이다. 형광영상은 형광의 소스가 어디에 있던지 간에 소스에서 나오는 빛을 찍는 것이 아니고, 소스에서 나온 빛이 여러 가지 광학현상을 거친 후 피부표면에 투영되는 빛을 찍는 것이다. 따라서 온 몸에 퍼져 있다면, 피부 및 피부의 모세혈관에도 존재할 것이고 여기의 형광물질이 가장 강하다. 초기에 온 몸에서 보이는 형광은 피부 표면에서 보이는 형광이다.

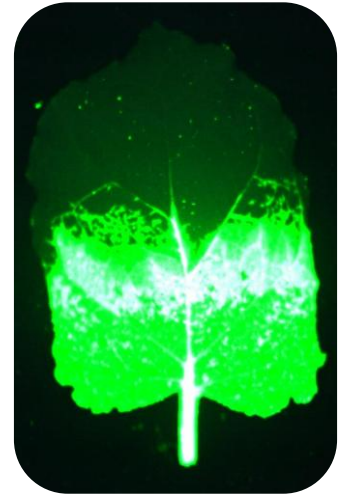
이렇게 온 몸에 퍼졌던 형광은 점차 시간이 지남에 따라 target조직을 향하고 그 target조직에서 형광이 점차 강하게 나타날 것이다. 그와 반대로 전체적인 몸에서의 형광은 줄어드는데 target조직으로 모이는 형광과 몸 밖을 빠져나가는 형광이 늘어나기 때문이다.

DDS 실험에서도 stem cell 실험과 마찬가지로 피부에 가까울수록 잘 보이기 때문에 폐와 심장과 같이 깊은 곳에 위치하고 있는 조직에서는 영상을 얻기 어렵다. 이런 경우, 해부를 해서 연 상태에서 영상을 얻거나 Ex Vivo로 영상을 얻어야 한다.

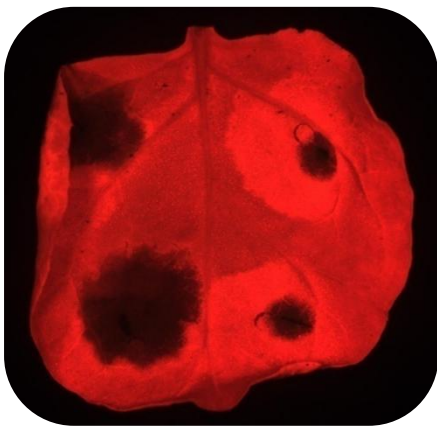
4. Plant

식물에서도 GFP발현과 같은 영상을 얻을 수 있다. 식물은 종자, 뿌리, 잎 등의 조직에서 GFP발현을 관찰할 수 있다.

종자나 뿌리에는 chlorophyll이 없기 때문에 자가형광이 문제되지 않는다. 다만, 종자나 뿌리가 흰색일 경우, 모든 빛을 반사시키기 때문에 Excitation light가 반사되어 detection되는 경우가 있다. 그렇기 때문에 negative control을 같이 두어서 그 차이를 확인하여야 한다.



잎의 경우 chlorophyll에서 아주 강력한 자가형광이 나온다. 여기서 나오는 자가형광은 Red 계열이기 때문에 GFP와는 상관없을 것 같지만, 자가형광의 강도가 강하기 때문에 GFP의 영상을 덮어버리는 현상이 있다. 이 때, cyan filter를 이용하여 빨간색의 파장을 제거하면 GFP만 남아 깨끗한 영상을 얻을 수 있다.



GFP영상을 얻을 때 문제가 되었던 chlorophyll은 다른 용도로 쓰이기도 한다. Chlorophyll은 엽록체에 존재함으로써 대부분의 잎에서 발현한다. 이 chlorophyll의 자가형광 영상을 이용하여 건강상태를 확인할 수 있다. 즉, 발현 정도가 일정치 않고 정상적이지 않을 경우 그 잎의 건강상태가 정상적이지 않다고 볼 수 있다.

just as it is...