

신경해부학 실습에서 Copper Phthalocyanine dye를 이용한 뇌줄기 염색

박유현¹, 허미선², 오창석¹

¹성균관대학교 의과대학 해부세포생물학교실, ²대구가톨릭대학교 의과대학 해부학교실

Staining of the Brainstem by Using Copper Phthalocyanine Dye in the Course of Neuroanatomy

Yuhyun Park¹, Mi-Sun Hur², Chang-Seok Oh¹

¹Department of Anatomy and Cell Biology, Sungkyunkwan University School of Medicine

²Department of Anatomy, Daegu Catholic University School of Medicine

Abstract : Brainstem seems to be one of the structures difficult for studying and dissecting in the course of neuroanatomy. It is because the diverse nuclei including cranial nerve nuclei and many bundles of fibers are packed in the limited space of the structure, and the cranial nerves from III to XII emerge from its surface. A method using plastic cup models has been already introduced for overcoming the difficulties of students' studying the brainstem, which was useful for expressing the components of cranial nerves, but had limitations for expressing the structures inside the brainstem. The empty space of plastic cups made it difficult for the internal structures to be fixed at their proper positions. Hence, the copper phthalocyanine dye was applied to stain the gray matter of brainstem, which showed effective educational results.

Keywords : Brainstem, Cranial nerve nuclei, Neuroanatomy, Copper phthalocyanine dye

서 론

신경해부학 교육과정에서 학습과 실습에 어려운 구조 중 하나는 뇌줄기이다. 불규칙한 원통형의 좁은 구조 안에 많은 핵과 섬유 다발들이 복잡하게 얽혀있고, 뇌줄기의 표면에선

3번부터 12번까지의 뇌신경이 나오기 때문이다. 근래 가상현실(Virtual Reality, VR) [1,2], 증강현실(Augmented Reality, AR) [3], 3D printing [4] 등 IT 기술 및 컴퓨터 공학의 발달에 힘입어, 신경해부학의 교육에도 새로운 방법이 도입되고 있으나, 적지 않은 재정적인 장벽 때문에 이들 장비와 시설을 구입하고 구축하기가 현실적으로 쉽지 않다. 이 같은 장벽을 넘기 위해, 즉 경제적인 부담이 없으면서도 어느 정도의 교육 성과를 이룰 수 있는 방안으로, 플라스틱 컵을 이용한 뇌줄기 모형 제작이 보고된 바 있다[5]. 이 방법은, 투명한 3개의 플라스틱 컵으로 뇌줄기의 전체 모양을 잡은 후, 실, 철사, 진흙 등 다양한 재료를 이용하여 내부의 핵과 표면에서 나가는 뇌

저자(들)는 '의학논문 출판윤리 가이드라인'을 준수합니다.

저자(들)는 이 연구와 관련하여 이해관계가 없음을 밝힙니다.

Received: September 6, 2023; **Revised:** October 23, 2023;

Accepted: November 4, 2023

Correspondence to: 오창석 (성균관대학교 의과대학 해부세포생물학교실)

E-mail: changoh@skku.edu

신경들을 표현한 것으로, 학생들이 뇌줄기의 3차원적인 구조를 이해하는 데 특히 도움이 되었다. 그러나, 컵의 내부가 비어있어, 뇌줄기 내부의 핵들을 본래의 위치와는 무관하게 일률적으로 컵의 안쪽 벽에 붙여야 하는 문제가 있었으며, 내부의 섬유다발들을 표현하는 데도 한계가 있었다(Fig. 1). 이 연구에서는, 이 같은 한계를 극복하고자 copper phthalocyanine dye [6]를 이용하여 뇌줄기 절편을 염색하였다. 뇌절편 염색을 위한 기존의 Mulligan 방법[7]은 여섯 단계로 구성되어 과정 자체가 복잡했고, 시일이 경과되면 변색되는 단점이 있는 반면, copper phthalocyanine dye를 이용한 방법은 두 단계의 염색과정과 변색되지 않는 장점이 있다. 이 방법으로 뇌줄기 내부의 다양한 크기와 모양의 많은 핵들을 염색함으로써, 학생들의 뇌줄기 학습 효과를 높이고자 시도되었다.

재료 및 방법

저자들의 의과대학 신경해부학 실습은 본과 1학년 전체 학생 45명을 8조로 나누어 진행하였고, 뇌줄기 염색 또한 각 실습조별로 진행하였다. 실습에 사용된 시신의 연령 분포는 52~87세였고, 남녀 각각 4구씩이었다. 뇌실습을 위해 적출한 뇌에서 뇌줄기를 분리한 다음, 1 cm 두께로 연속 수평절단하였는데, 절단 위치는 모두 8군데였고, 신경해부학 교과서 Snell's Clinical Neuroanatomy 8th ed. [8]에 따랐다. 즉, 중간뇌(Midbrain)에서는 위둔덕(superior colliculus)과 아래둔덕(inferior colliculus)에서, 다리뇌(Pons)에서는 삼차신경핵(trigeminal nucleus)과 얼굴신경둔덕(facial colliculus)에서, 숨뇌(Medulla oblongata)에서는 다리뇌 바로 아래, 아

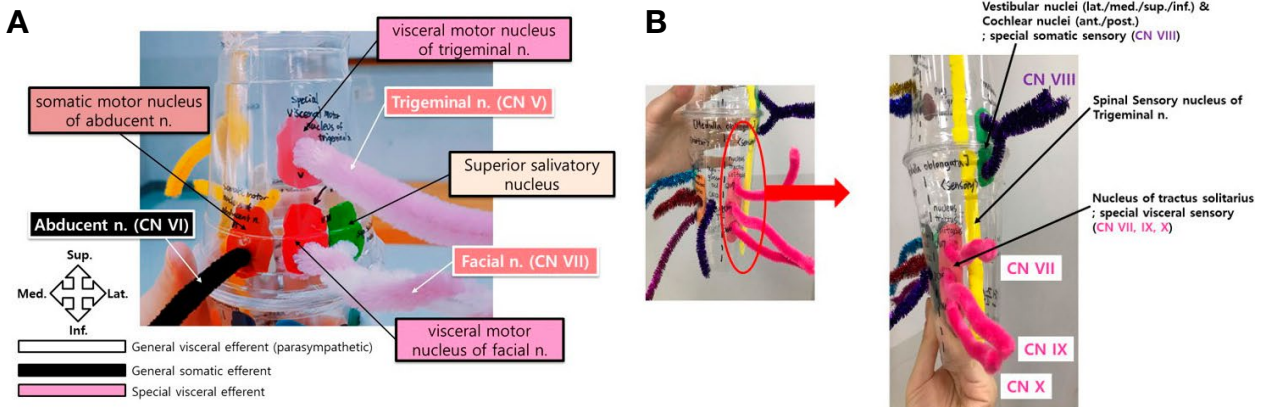


Fig. 1. Students' plastic cup models representing pons (A) and medulla oblongata (B).

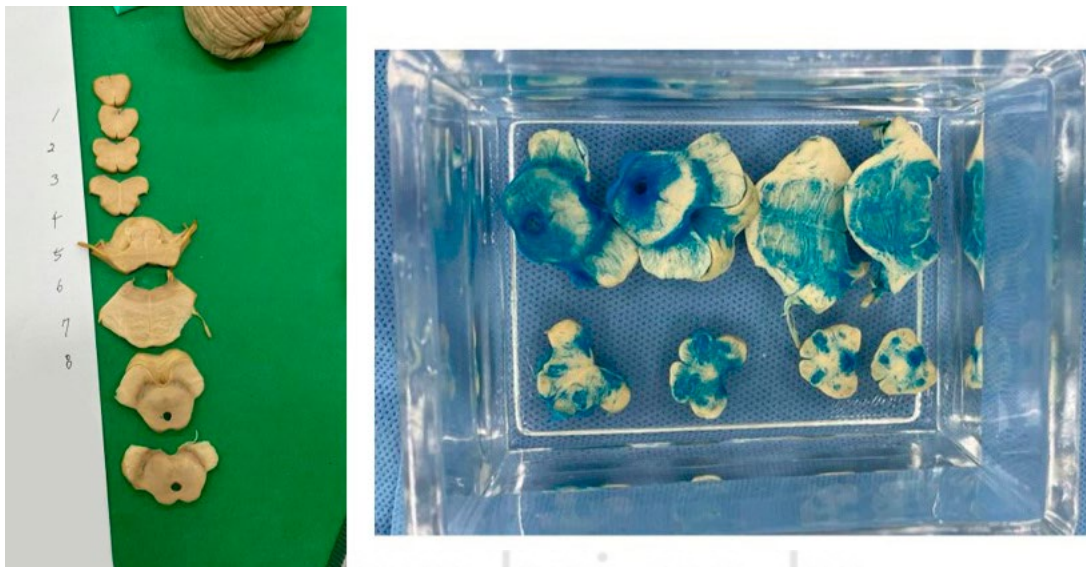


Fig. 2. Students' digital report showing the results of copper phthalocyanine dye staining of 8 slices of brainstem.

래소뇌다리(inferior cerebellar peduncle), 안쪽섬유띠교차(decussation of medial lemniscus), 피라미드교차(pyramidal decussation)에서 절단하였다. 이들 8개 절편을 copper phthalocyanine dye를 이용하여 염색하였다.

이 방법에는 두 종류의 용액이 사용되었는데, 이들은 Mulligan's phenol solution (1차 염색액)과 copper phthalocyanine tetrasulfonic acid solution (2차 염색액)이다. 1차 염색액의 조성은, phenol 40 g, hydrochlorid acid 1.25 mL 및 cupric sulfate 5.0 g으로, 증류수를 이용해 최종 용량을 1 L로 만들었다. 한편, 2차 염색액은, 증류수 1 L에 copper phthalocyanine tetrasulfonic acid (CPTS), tetrasodium salt (catalog

#274011-50G, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) 30 g을 넣고 자석교반기(magnetic stirrer)를 이용해서 최소 60분 동안 저어주면서 포화용액을 만들었다. 뇌줄기 절편을, 60°C로 유지된 1차 염색액에 5분간 침전 후, 10°C 증류수로 옮긴 다음 천천히 흐르는 수돗물로 약 1분간 씻었다. 이후 상온에서 2차 염색액에 10~15분 침전 후, 천천히 흐르는 수돗물로 최소 15분 이상을 씻었다. 염색된 뇌줄기 절편들은 각 조별로 digital report 형식으로 만들어 - 염색된 뇌줄기 사진을 찍고, 구조를 표기함 - 대학 홈페이지의 TMDR (Touch Manual & Digital Report) 도메인을 통해 on-line 제출하였다[9]. 이후 절편들은, 희석된 acetic acid (0.5%)에 보관하였다.

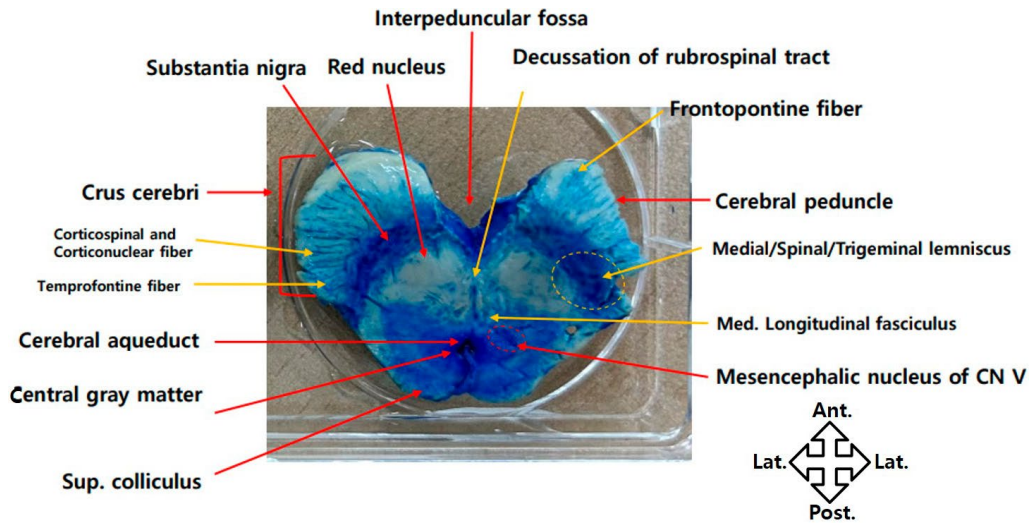


Fig. 3. Students' digital report showing the stained slice of midbrain at the level of superior colliculus.

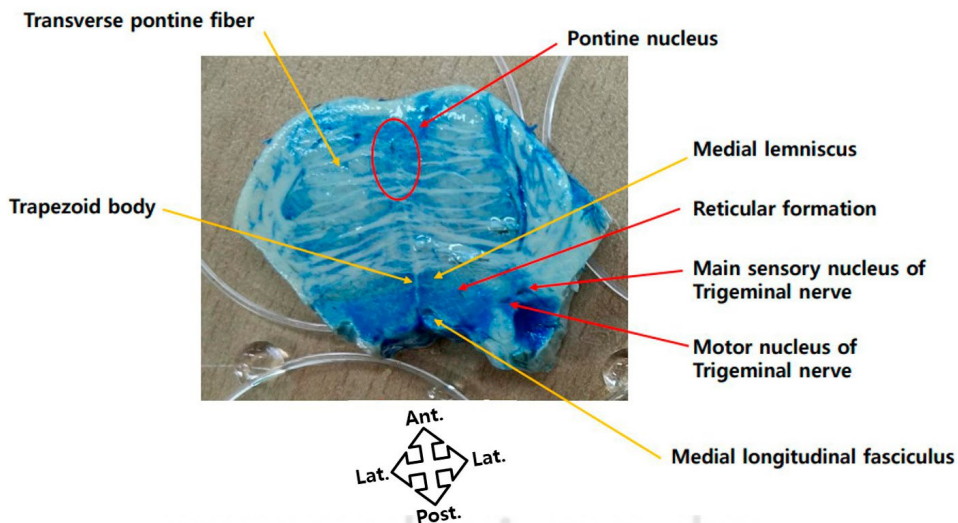


Fig. 4. Students' digital report showing the stained slice of pons at the level of trigeminal nuclei.

결과 및 고찰

염색하기 전과 후의 뇌줄기 단면은, 염색의 효과를 확실히 보여준다(Fig. 2). 기본적으로 신경세포의 세포체가 집결되어 있는 부위는 파란색으로 염색되었지만, 섬유다발이 집결되어 있는 부위는 염색되지 않았다. 염색 정도 또한 구조에 따라 달랐다. 뇌줄기 각 절편에서 염색 결과로 구분되는 구조를 간략히 정리하면 다음과 같다. (1) 중간뇌, ① 위둔덕 높

이; 흑색질(substantia nigra), 위둔덕과 중심 회색질(central gray matter)은 잘 염색되어 쉽게 구분되는 반면, 적색핵(red nucleus)과 섬유띠(lemniscus), 적색척수로 교차(decussation of rubrospinal tract)는 염색되지 않아, 이들 구조의 위치로 파악할 수 있었다(Fig. 3). 특히 적색핵의 경우, 1개 조를 제외한 나머지 7개 조에서 극히 약하거나 전혀 염색되지 않았는데, 그 이유에 대해선 추후 연구가 필요할 것 같다. ② 아래둔덕 높이; 아래둔덕과 도르래신경핵(nucleus of trochlear

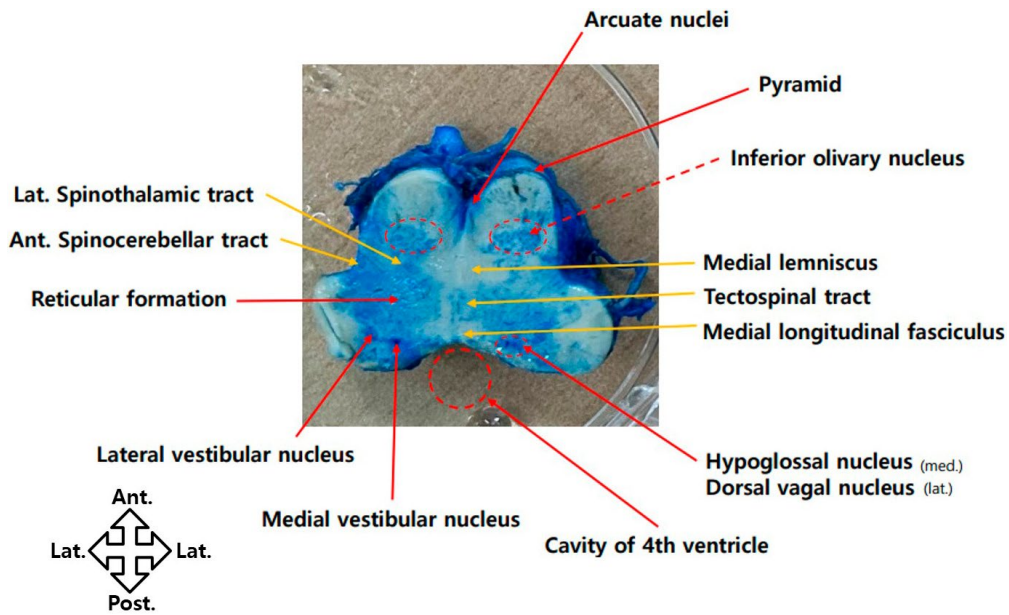


Fig. 5. Students' digital report showing the stained slice of medulla oblongata just inferior to pons.

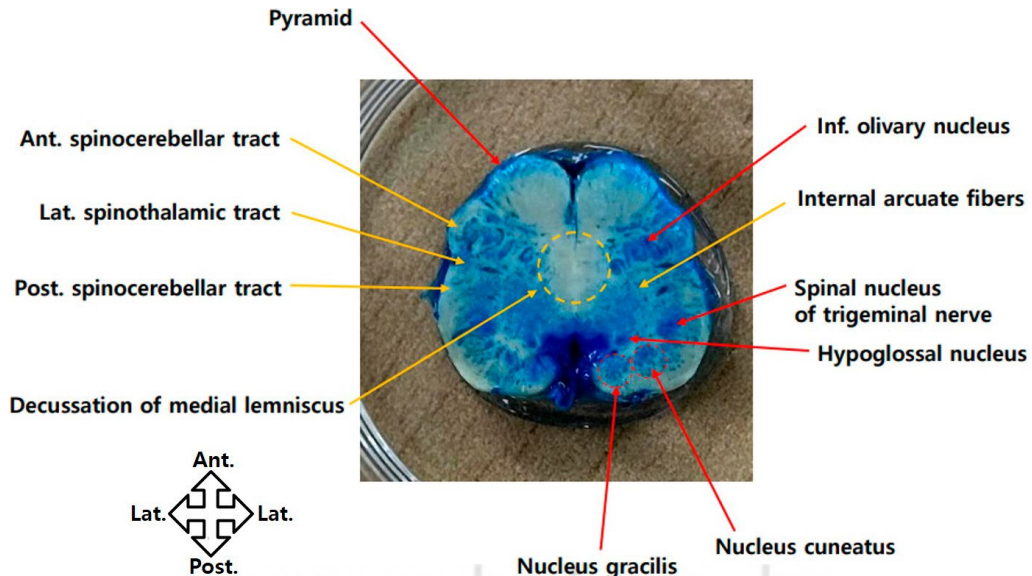


Fig. 6. Students' digital report showing the stained slice of medulla oblongata at the level of decussation of medial lemnisci.

	1조	2조	3조	4조	5조	6조	7조	8조
Skull Base								
Cavernous sinus	○		△	△	x		x	△
Trigeminal ganglion	○	○	x	○	△	○	○	△
* DR #93 참조								
		4	2	1	3	1	2	2
Cerebrum								
<i>Cranial nerves</i>	○		○	○		○	○	○
<i>Cb arteries</i>	○	○	○	○	○	○	○	○
Sulci, Gyri	○	○	○	○	○	○	○	○
Brodmann	○	○	○	○	○	○	○	○
Midsagittal section	○	○	○	○	△	○	○	○
Insula	○	○	○	○	○	○	○	○
Sup & Inf long fasc	○	○	△	○	○	○	○	○
Association fiber	○	○	?	○	○	?	○	○
Optic radiation	○	○	○	○	○	○	○	○
Corona radiata	○	○	○	○	○	○	○	○
Ext capsule	○	○	○	△	○	○	○	○
Lentiform ncl	○	○	○	○	○	○	○	○
Lat vt	○	○	○	○	○	○	○	○
Hippocampus	○	○	○	○	○	○	○	○
Amygdaloid body	○	?	○	△	?	?	?	?
Caudate ncl	○	○	○	○	○	○	○	○
		32	28	29	30	27	28	30
Brain Stem								
Ant surf	○	○	○	○	○	○	○	○
Post surf	○	○	△	○	△	○	△	△
Cbill pd, sup md inf	○	○	○	△	△	○	○	○
<i>Staining (transv section, 8 levels)</i>		<i>15</i>	<i>15</i>	<i>15</i>	<i>14</i>	<i>13</i>		
<i>MB (2 levels) x2점</i>								
<i>Pons (2) x2점</i>								
<i>MO (4) x2점</i>								
		21	21	20	19	17		
Cerebellum								
Sup surf	○	○	○	○	○	○	○	○
Inf surf	○	○	○	○	○	○	○	○
Midsagittal section	○	○	○	○	○	○	○	○
For of Magendie and Luschka	○	?	?	△	△	○	○	○
합계		65	57	56	59	52	60	61
								57
* Read Sheet 2 (Dissection of fiber)								
*Amygdaloid body: DR #144 (2019 본4 Elective)								
Photos of the Week								
○ 2점, △ 1점								
E								

user:
slide #34, central gray matter 틀림/
slide #36, labeling 너무 적음, 4th ventricle 틀림/
slide #40, 41, pyramid 빠뜨림

Fig. 7. Evaluation sheet for digital reports which students submit in the neuroanatomy lab course. Scores of brainstem staining performances are represented in italic font. Teacher's comments are inserted in the memo boxes of each cell marked.

nerve)은 염색되어 구분할 수 있었으나, 위소뇌다리(superior cerebellar peduncle)와 이들을 구성하는 섬유들의 교차, 안쪽세로다발(medial longitudinal fasciculus) 등은 염색되지 않았다. (2) 다리뇌, ① 삼차신경핵 높이; 가로다리뇌섬유

(transverse pontine fiber)와, 이들과 직각으로 주행하는 걸질척수섬유다발(corticospinal fiber bundle)과 걸질핵섬유다발(corticonuclear fiber bundle)이 뚜렷이 구분되었다. 단면의 앞쪽 정중앙에 위치한 다리뇌핵(pontine nuclei)은 염색되어

있었지만, 뒤쪽 중앙에 위치한 마름섬유체(trapezoid body)는 염색되어 있지 않았으며, 그 위치로 추정할 수 있었다. 그 외, 삼차신경핵도 구분되었다(Fig. 4). ② 얼굴신경둔덕 높이; 얼굴신경핵과 갓돌림신경핵(nucleus of abducens nerve)이 구분되었다. (3) 숨뇌, ① 다리뇌 바로 아래와 올리브핵 중간 높이; 아래올리브핵(inferior olivary nucleus)과 안쪽덧올리브핵(medial accessory olivary nucleus)은 따로 떨어져 있어 쉽게 구분되었지만 그물체(reticular formation)와 인접해 있는 다른 핵들 - 예를 들어, 미주신경뒤핵(dorsal nucleus of vagus nerve), 혀밑신경핵(nucleus of hypoglossal nerve), 안뜰핵(vestibular nucleus) - 은 특정하기가 쉽지 않았다. 비록 염색되지는 않았지만, 위치상으로 피라미드(pyramid), 아래소뇌다리, 안쪽섬유띠(medial lemniscus), 뒷개척수로(tectospinal tract) 등을 알 수 있었다(Fig. 5). ② 안쪽섬유띠교차 및 피라미드교차 높이; 췌기핵(cuneate nucleus), 널판핵(nucleus gracilis), 삼차신경척수핵(spinal nucleus of trigeminal nerve)은 잘 구분되었고, 안쪽섬유띠교차, 피라미드교차는 염색되지는 않았지만, 그 위치로 알 수 있었다(Fig. 6).

한편, 염색 결과는 조에 따라 차이가 있었다. 염색과정 자체는 두 단계로 복잡하지 않고 비교적 단순했지만, 뇌졸기 절단부터 염색을 마칠 때까지 실습 학생들의 조에 따른 미세한 차이 - 1차 및 2차 염색액에 절편을 침전시키는 시간, 1차 염색 후 10°C 증류수에 넣어 두는 시간, 각 염색 후 수돗물 washing 시간 등 - 가 있었을 것으로 보이며, 이런 차이들이 염색 결과에도 영향을 미쳤을 것이다. 더 중요한 원인은, 시신의 고정 상태에 있었을 것으로 생각된다. 즉, 사망 원인 - 뇌출혈 등 뇌질환인 경우는 뇌 보존 상태가 당연히 좋지 않음 - 과 사망 이후 방부 처리 때까지의 시간 등은 시신의 고정 상태에 영향을 줄 것이며, 이는 결국 염색 결과를 결정할 수도 있을 것이기 때문이다. 실습조별 염색 결과는 digital report 형태로 대학 홈페이지의 TMDR을 통해 제출된 후, 담당과목 교수에 의해 평가되었고, 엑셀 양식의 평가표 또한 TMDR에 게재되었다(Fig. 7). 부적절하거나 틀린 표기 (labelling)는 평가표의 메모란을 통해 학생들에게 전달되었다. 신경해부학 교육과정이 끝난 후, 의과대학 의학교육실에서 주관한 교과목에 대한 학생 의견 조사를 보면, 신경해부학 실습(5명)과 실습 때의 뇌졸기 염색(1명)에 대해 긍정적으로 서술한 부분이 눈에 띈다. 이번 연구에서 시도한 뇌졸기 염색에 대한 별도의 설문조사를 시도했었다면, 교육효과를 보

다 구체적으로 평가할 수 있었을 것으로 생각된다. 그리고, 이 연구에서는 학생들을 대조군과 실험군으로 구분한 후 성적을 비교하는 방법을 시행하지 않았는데, 그 이유는 모집단의 수가 45명으로 적었을 뿐 아니라 교육적 긍정 효과가 예상되는 뇌졸기 염색을 절반의 학생들에게 시도하지 않을 수는 없었기 때문이었다. 결론적으로, 신경해부학 교육과정에서 학습과 실습이 어려운 뇌졸기를 대상으로, 투명플라스틱 컵을 이용한 방법[5]을 통해 뇌졸기 표면에서 나오는 뇌신경과 이들 신경에 포함된 다양한 성분을 입체적으로 학습하고, 그리고 copper phthalocyanine 염색[6]을 통해 뇌졸기 내부 구조를 학습한다면, 전체 뇌졸기 구조에 대한 학습 효과를 높일 수 있을 것으로 사료된다.

REFERENCES

1. Plumley L, Armstrong R, De Ribaupierre S, Eagleson R. Spatial ability and training in virtual neuroanatomy. In: Westwood JD, Westwood SU, Felländer-Tsai L, Haluck RS, Robb RA, Senger S, Vosburgh KG, editors. *Medicine Meets Virtual Reality 20*. IOS Press. 2013. pp. 324-9.
2. Kockro RA, Amaxopoulou C, Killen T, Wagner W, Reisch R, Schwandt E, et al. Stereoscopic neuroanatomy lectures using a three-dimensional virtual reality environment. *Ann Anat*. 2015; 201:91-8.
3. Küçük S, Kapakin S, Göktas Y. Learning anatomy via mobile augmented reality: Effects on achievement and cognitive load. *Anat Sci Educ*. 2016;9:411-21.
4. Javan R, Herrin D, Tangestanipoor A. Understanding spatially complex segmental and branch anatomy using 3D printing: Liver, lung, prostate, coronary arteries, and circle of Willis. *Acad Radiol*. 2016;23:1183-9.
5. Hur MS, Jang HW, Oh CS. Learning brainstem anatomy using plastic cup models. *Anat Biol Anthropol*. 2021;34:7-12.
6. Wu M, Kiernan JA. A new method for surface staining large slices of fixed brain using a copper phthalocyanine dye. *Biotech Histochem*. 2001;76:253-5.
7. Mulligan JH. A method of staining the brain for macroscopic study. *J Anat*. 1931;65:468-73.
8. Splittgerber R. *Snell's clinical neuroanatomy*, 8th edition. Philadelphia: Wolters Kluwer; 2019.
9. Oh CS, Kim KJ, Chung E, Choi HJ. Digital report in an anatomy laboratory: a new method for team-based dissection, reporting, and evaluation. *Surg Radiol Anat*. 2015;37:293-8.

간추림 : 뇌졸기는 신경해부학 실습과정에서 까다롭고 어려운 구조 중 하나이다. 뇌신경 핵을 포함한 다양한 핵들과 많은 섬유 다발들이 작은 공간에 밀집되어 있고, 3번부터 12번까지의 뇌신경들이 뇌졸기 표면에서 나오고 있기 때문이다. 이 같은 이유로 인한 뇌졸기 실습의 어려움을 극복하고자, 일찍이 투명플라스틱 컵을 이용한 방법을 고안했었다. 이 방법은, 뇌졸기에서 나오는 뇌신경의 다양한 성분을 표현하는 데는 적절했지만, 뇌졸기 내부의 핵들과 섬유 다발들을 표현하는 데는 한계가 있었다. 왜냐하면, 비어있는 플라스틱 컵 내부의 공간에 핵들과 섬유 다발들을 고정하기가 어려웠었기 때문이다. 이 연구에서는, 대뇌의 회색질 염색이 보고된 바 있는 copper phthalocyanine dye를 뇌졸기에 적용했으며, 이를 통해 효과적인 뇌졸기 실습을 진행할 수 있었다.

찾아보기 낱말 : 뇌졸기, 뇌신경핵, 신경해부학, copper phthalocyanine dye