



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

의학 석사 학위 논문

센서 융합형 재생 말초 신경 인터페이스  
(Regenerative peripheral nerve interface)의  
바이오닉 인터페이스로서의 잠재력을 확인하기  
위한 토끼 모델 실험 연구

Validation of Sensor Hybrid Regenerative Peripheral  
Nerve Interface As Bionic Interface For Robotic  
Prosthesis Control: A Rabbit Model

울 산 대 학 교      대 학 원

의 학 과

정 형 화

센서 융합형 재생 말초 신경 인터페이스  
(Regenerative peripheral nerve interface)의  
바이오닉 인터페이스로서의 잠재력을 확인하기  
위한 토끼 모델 실험 연구

지도교수 홍준표

이 논문을 의학석사 학위 논문으로 제출함

2024년 2월

울산대학교 대학원

의학과

정형화

정형화의 의학석사 학위 논문을 인준함

심사위원 서 현 석 (인)

심사위원 홍 준 표 (인)

심사위원 한 현 호 (인)

울 산 대 학 교 대 학 원

2024 년 2 월

## 국 문 요 약

### 연구 목적

절단 수술은 다양한 원인으로 이루어지며, 대표적인 원인으로서는 외상, 관상동맥질환, 당뇨병 합병증 등이 있다. 노령 인구의 증가와 만성 질환의 확산으로 인해 절단 수술의 빈도는 늘고 있으며 특히 당뇨병으로 인한 하지 절단은 꾸준한 증가세를 보이고 있다. 현재 사지 절단 환자 대상 치료법은 수술과, 의지 적용의 두 가지 선택지로 나눌 수 있다. 이 중 의지 기술은 현재 많이 개선되어 동종 이식수술의 단점을 뛰어넘으면서 그 적응증을 세분화하는 수준에까지 와 있다는 연구도 있다. 그러나 바이오닉 의지가 절단된 사지의 기능을 완전히 대체하기 위해서는 직관적인 조작이 필수적이며 이를 위해서는 사용자의 의도가 정확하게 파악되고 그 파악된 움직임은 의지의 기계부에 효과적으로 전달되는 회로가 있어야 한다. 재생말초신경인터페이스 (RPNI - Regenerative Peripheral Nerve Interface) 수술은 신경절단 단에 원통 형태의 비혈관화된 유리 근육이식편을 고정하는 비교적 간단한 수술법으로 미국 미시간 대학교를 위시한 여러 연구에서 이 인터페이스를 통해 로봇 의지를 작동하는 데에 성공한 바 있다. 그러나 아직까지 효과적인 신호 획득을 위해서는 미리 작성되어있는 신경 인터페이스로 외부로부터 전극을 직접 삽입하는 비교적 침습적인 방법을 사용하도록 되어 있다. 본 연구에서는 센서를 신경 인터페이스 작성 단계에서 함께 삽입하는 센서 융합형 신경 인터페이스를 만들고 이 인터페이스의 장기간 삽입시의 생물학적 안정성과 재신경화 정도, 신경 생리학 검사를 통한 원심성 (efferent) 신호 획득 인터페이스로서의 잠재력을 확인하고자 한다.

### 연구 방법

총 5마리의 New Zealand White (NZW) 토끼 (3.0 - 3.3 kg)을 대상으로 실험을 진행하였다.

#### 1. 센서 융합형 신경 인터페이스 모델 생성

토끼의 뒷다리에 무릎 위쪽 부위부터 상전장골극 (ASIS) 으로부터 전방 3cm 부위까지 허벅지 외측에 절개를 시행하였다. 앞쪽 및 뒤쪽으로 충분히 피하층 박리를 시행한 후 심부근막을 열고 대퇴이두근과 외측광근 사이의 격막을 박리하여 좌골신경을 박리하였다. 이후 좌골신경 말단에서 경골신경, 비골신경, 비복신경이 분지되는 부위까지 박리를 시행하였다.

## 2. 전기생리학적 검사

신경전도검사는 수술 후 4주일이 되는 시점에 두 번 시행하였다. 신경 자극을 위하여 신경 인터페이스로부터 약 3cm근위부의 좌골신경에 2채널 커프 전극 (Nerve Cuff Electrodes; MicroProbes)을 위치시켰다. 자극 신호는 양극형 (bipolar) 신호로 1분간 12회 가하였다. 전기 자극 매개변수는 50 마이크로초( $\mu$ s)의 길이로 50  $\mu$ A, 100  $\mu$ A, 150  $\mu$ A, 200  $\mu$ A, 250  $\mu$ A, 300  $\mu$ A의 강도를 적용하였다.

## 3. 병리조직 채취

수술 후 29주일이 되는 시점에 기존 시술부위에서 병리조직을 채취하여 조직 검사 및 검경을 시행하였다. 병리조직은 Haematoxylin & Eosin (H&E) 염색 및 Bungarotoxin, Desmin, NF200 면역형광염색을 시행하였다. 병리조직 채취는 센서 융합형 RPNI 및 정상 대퇴사두근 근육, 탈신경화 (de-neurotized) 비복근, 정상 경골신경-비복근 신경근 접합부위로부터 각각 획득하였다.

## 4. 통계 분석

각 신호 강도별 최대 신호 진폭 (peak amplitude)의 평균값을 분산분석 (Analysis of variance, ANOVA)를 통해 분석하였고 각 군간의 차이를 Tukey post hoc 검정을 통해 비교하였다. 또한 병리조직검사 중 면역형광염색의 염색 정도 및 면적을 RPNI, 정상 대퇴사두근 근육, 탈신경화 비복근, 정상 경골신경-비복근 신경근 접합부위의 각각의 군에서 Image J 프로그램을 통해 구하였다. 각 면적 및 염색 강도를 t-test를 통해 비교하였다. 통계분석은 IBM SPSS Version 21.0 (IBM Corp., Armonk, N.Y.) 프로그램을 사용하여 시행하였으며, 통계적 유의성의 기준은 p값이 0.05 미만인 경우로 설정하였다.

## 결과

### 1. 신경전도검사 결과의 비교

분산분석 결과상 각 자극세기에 따른 피크신호의 강도에 유의한 차이가 있었다. ( $p$ -value <0.001) 50  $\mu$ A, 100  $\mu$ A, 150  $\mu$ A 에서 평균 피크 신호의 강도는 200  $\mu$ A, 250  $\mu$ A, 300  $\mu$ A 와 유의한 차이를 보였으며 50  $\mu$ A, 100  $\mu$ A, 150  $\mu$ A 군간과 200  $\mu$ A, 250  $\mu$ A, 300  $\mu$ A 군 간에는 피크 신호의 강도에 유의한 차이가 없었다.

## 2. 조직학적 검사

Bungarotoxin 염색에서는 탈신경근육조직에서 형광염색의 범위가 가장 작았다. 독립 t-test상 센서융합 말초신경인터페이스에서의 형광염색범위는 정상 신경근접합부의 범위와 유의한 차이를 보이지 않았으며 ( $p=0.249$ ) 탈신경근육조직과는 유의한 차이를 보였다. ( $p=0.046$ )

NF200 면역형광 염색 범위는 t-test 검정상 정상 신경근 접합부와 탈신경 근육간에 유의한 차이가 있었으며 ( $p=0.002$ ) 센서융합 말초신경인터페이스의 염색 범위와 탈신경 근육 간에도 차이가 있었다. ( $p=0.004$ ) 정상 신경근 접합부와 말초신경 인터페이스간에는 유의한 차이를 보이지 않았다. ( $p=0.297$ )

Vimentin 면역형광 염색 범위는 t-test 검정상 센서 융합 말초신경 인터페이스에서 정상근육, 탈신경근육, 정상 신경근 접합부에서 모두 유의한 차이를 보였다. ( $p<0.001$ )

## 결론

본 연구는 신경 절단면과 유리 근육 사이에 센서를 삽입하여 작성한 신경 융합형 재생 말초신경 인터페이스의 장기적 생물학적 안정성과 신호 획득 매개로서의 유효성을 중대동물 모델에서 구현한 연구이다. 본 기술이 안정화 될 경우 작성 단계부터 센서를 삽입하기 때문에 추후 센서 전극 삽입시 발생할 수 있는 부작용 및 교란 요인을 최소화 하면서 신경으로부터 나오는 작은 신호를 증폭하는 재생신경 인터페이스의 장점을 극대화 할 수 있다는 점에서 추후 바이오닉 의지의 핵심 기술로서 작용할 가능성이 높다.

## 차 례

국문요약.....	i
표차례.....	v
그림차례 .....	vi
서론.....	1
재료 및 방법.....	3
결과 .....	6
고찰 .....	8
결론.....	11
참고문헌.....	12
표.....	13
그래프 및 그림.....	16
영문요약.....	34



## 표 차례

표 1. 신경전도검사 결과

표 2. 각 신호 세기별 신경전도검사상 최대 신호 크기의 통계학적 비교

표 3. 면역 형광염색 범위 분석

## 그림차례

Figure 1. 토끼 좌골신경 박리

Figure 2. 근육절편의 획득

Figure 3. 신경과 근육 절편 사이에 센서를 삽입함으로써 센서 융합형 재생 말초신경 인터페이스를 작성

Figure 4. 작성이 완료된 센서 융합형 재생 말초신경 인터페이스

Figure 5. 토끼의 후두부로 빠져나와 있는 헤드포트의 모습

Figure 6. 신경전도검사 전체 모식도

Figure 7. 근위부 좌골신경에 자극용 hook을 위치한 모습

Figure 8. 각 자극 세기별 12회의 신경전도검사 자극시의 파형 전체를 표현한 그래프의 예시

Figure 9. 각 시점별 평균값을 이용한 신경전도검사 그래프

Figure 10. 29주 후 박리된 센서 융합형 말초신경 인터페이스

Figure 11. 채취된 센서 융합형 말초신경 인터페이스의 모습

Figure 12. H & E 염색결과

Figure 13. Bungarotoxin 면역형광염색 결과

Figure 14. NF200 면역형광염색 결과

Figure 15. Vimentin 면역형광염색 결과

Figure 16. Bungarotoxin 면역염색 부위의 정량적 분석 결과

Figure 17. NF200 면역염색 부위의 정량적 분석 결과

Figure 18. Vimentin 면역염색 부위의 정량적 분석 결과

## I. 서론

신체 말단 절단 수술은 상당히 침습적이나, 광범위한 외상이 동반되어 있거나 감염 등으로 인해 치명적인 상황에서는 반드시 필요한 수술 중 하나이다. 미국 및 유럽에서 연간 약 242,230건의 말단 절단술이 87,088명의 환자에게 이루어지고 있으며 국내에서 역시 연간 1000건 이상의 주요 부위 절단술이 이루어지고 있다. 절단 수술은 다양한 원인으로 이루어지며, 대표적인 원인으로서는 외상, 관상동맥질환, 당뇨병 합병증 등이 있다. 노령 인구의 증가와 만성 질환의 확산으로 인해 절단 수술의 빈도는 늘고 있으며 특히 당뇨병으로 인한 하지 절단은 꾸준한 증가세를 보이고 있다. 이러한 현황으로 인해 국내 병원과 의료기관에서의 절단수술 자체 뿐만 아니라 수술 후 합병증 및 재활 관리의 필요성 역시 대두되고 있다. 현재 사지 절단 환자 대상 치료법은 수술과, 의지 적용의 두 가지 선택지로 나눌 수 있다. 수술적 치료법 중에서는 절단 사지의 기능적, 외형적 복원 효과가 뛰어난 동종이식이 현재 가장 각광을 받고 있으나, 장기간의 면역억제라는 근본적인 한계가 존재한다. 이에 대처점에 있는 의지 기술도 역시 발맞추어 많은 연구들이 이루어졌다. 의지의 조작성은 현재 많이 개선되어 동종 이식수술의 단점을 뛰어넘으면서 그 적응증을 세분화하는 수준에까지 와 있다는 연구도 있다.[1]

이렇게 바이오닉 의지가 절단된 사지의 기능을 완전히 대체하기 위해서는 직관적인 조작이 필수적이다. 직관적인 조작이란 사용자의 의도가 정확하게 파악되고 그 파악된 움직임은 의지의 기계부에 효과적으로 전달되는 회로가 있어야 한다. 이러한 사용자 의도 파악에 사용될 매개로서 뇌와 같은 중추신경계를 이용하는 것과 말초신경을 이용하는 방법이 각각 연구되었다. 이 둘을 비교해 보았을 때 말초신경을 사용하는 쪽이 사용 근육으로 가는 말초신경의 가지들을 이용하기 때문에 신호의 특이도를 높일 수 있는 것으로 여겨지고 있다.[2] 그 예로 절단부의 절단된 신경 말단을 찾아내어 해당 절단 신경 다발 내부에 직접 전극을 삽입하거나 절단단의 끝을 전극으로 감싸는 방법 등이 시도되었다. 그러나 이러한 신경 인터페이스에 있어서 근본적인 문제점으로는 이러한 전극들이 신경다발에 손상을 입힘으로써 발생하는 장기간 삽입시의 기계적 안정성과 신경종 형성 등과 같은 문제점들이 제기되어 왔다.[2-4]

이러한 신경 인터페이스들의 단점을 보완하기 위해 재생말초신경인터페이스 (RPNI - Regenerative Peripheral Nerve Interface) 수술이 고안되었다. RPNI 수술은 신경절단

단에 원통 형태의 비혈관화된 유리 근육이식편을 고정하는 비교적 간단한 수술법으로 신경이 절단된 유리근육이식편으로 절단된 운동 신경절단면으로부터 재신경화가 이루어지는 원리를 사용한다. 이 인터페이스의 장점으로는 신경으로부터 나오는 매우 낮은 전압의 신호를 재신경화된 근육절편으로부터의 신호로 증폭함으로써 비교적 높은 강도의 신호를 획득할 수 있다는 점이 대표적이다.[4] 이 인터페이스의 신호를 통해 미국 미시간 대학교를 위시한 여러 연구에서 로봇 의지를 작동하는 데에 성공한 바 있으나 아직까지 효과적인 신호 획득을 위해서는 미리 작성되어있는 신경 인터페이스로 외부로부터 전극을 직접 삽입하는 비교적 침습적인 방법을 사용하도록 되어 있다. 이러한 방식은 삽입 단계에서 혈종 혹은 감염등과 같은 위험성에 노출 될 가능성이 높으며 신호의 지속적이고 안정적인 획득이 어려울 수 있다.

따라서 본 실험에서는 추가적인 센서삽입과 같은 이차 수술 없이 신경 인터페이스 작성 단일단계 (one-stage)에서 센서를 함께 삽입하고 이 센서 융합형 인터페이스를 정상 신경근 접합부 및 탈신경 근육과 재신경화 정도 및 섬유화 정도를 비교하고자 한다. 이를 통해 인공 신경근 접합부의 형성정도를 평가하고, 신경 생리학 검사를 통하여 이 센서융합형 인터페이스에서 적절한 신호 획득이 가능한지를 확인하고자 한다.

## II. 재료 및 방법

### 실험대상

총 8마리의 New Zealand White (NZW) 토끼 (3.0 - 3.3 kg)을 대상으로 실험을 진행하였다.

### 사육환경

실험 기간 동안 모든 토끼는 개별 케이지에서 생활하였고, 물과 음식은 자유롭게 섭취할 수 있도록 제공하였다. 상온( $21 \pm 2^{\circ}\text{C}$ )과 적절한 습도( $60 \pm 5\%$ )를 제공하였고, 12:12 시간의 비율로 낮, 밤의 주기를 유지하였다. 모든 연구는 아산 생명과학 연구소의 동물 실험 윤리 위원회의 승인 하에 시행하였고, 윤리 규정을 준수하였다.

### 마취방법

마취는 마취 유도를 위해 0.2ml/kg의 alfaxalone 및 0.1ml/kg의 rompun 을 정맥주사하여 시행하였다. 마취 유지를 위해서는 호흡 마취를 사용하였고 isoflurane 을 2.5% 농도로 유지하였다. 수술은 토끼가 진정되어 심장 박동수가 안정화된 후 진행하였다.

### 1. 토끼의 센서 융합 신경 인터페이스 모델 생성

토끼가 호흡마취를 통해 충분히 안정된 이후 좌측 뒷다리 부분을 삭모하였다. 수술 부위를 베타딘 10% 용액을 이용하여 소독하였다. 토끼의 뒷다리에 무릎 위쪽

2cm부위부터 상전장골극 (ASIS) 으로부터 전방 3cm 부위까지 허벅지 외측에 절개를 시행하였다. 앞쪽 및 뒤쪽으로 충분히 피하층 박리를 시행한 후 심부근막을 열고 대퇴이두근과 외측광근 사이의 격막을 박리하여 좌골신경을 박리하였다. 이후 좌골신경 말단에서 경골신경, 비골신경, 비복신경이 분지되는 부위까지 박리를 시행하였다. (Figure 1)

좌골신경의 신경 분지 기준으로 원위부 2cm 지점에서 경골신경을 박리 및 절단한 후 대퇴이두근을 넓이 2x2cm, 두께 3mm만큼 박리하여 만든 근육 절편을 (Figure 2) 경골신경 말단에 약 2.5cm가량 겹치도록 올려놓은 후 Ethilon (Nylon; Ethicon, Somerville, NJ, USA) 8-0를 이용해 근육의 표면과 신경의 신경외막 (epineurium)을 봉합하여 고정하였다. 이후 1,3,5-Triallyl-1,3,5-triazine-2,4,6(1H,3H,5H)-trione (TATATO) (Sigma-Aldrich Korea), trimethylolpropanetrakis(3-mercaptopropionate) (TMTMP) (Sigma-Aldrich Korea), tricyclodecanedimethanoldiacrylate (TCMDA) (Sigma-Aldrich Korea), and 2,2-dimethoxy-2-phenyl-acetophenone (DMPA) (Sigma-Aldrich Korea)를 이용하여 합성한 중합체의 표면에 크롬 (Cr; 50nm) 및 금 (Au, 200nm) 재질의 전극을 올린 신경 삽입형 센서를 근육과 신경 사이에 삽입하였다. (Figure 3) 해당 센서가 신경을 감싸도록 한 후 고정하고 근육 절편으로 센서와 신경을 다시 감싼 뒤에 Ethilon 8-0를 이용해 고정하여 센서 융합형 재생 말초신경 인터페이스를 형성하였다. (Figure 4)

센서의 신호를 받을 수 있는 헤드포트를 토끼의 등 표면에 위치시키기 위해 후두부와 경추가 만나는 지점으로부터 5cm 꼬리쪽의 등 표면에 1cm가량의 절개를 가하고 해당 절개로부터 뒷다리의 절개부에 달하는 피하층 터널을 켈리 포셉을 이용해 형성하였다. (Figure 5) 그리고 피하층에 센서 선을 정리한 후 헤드포트를 등 절개부 밖으로 위치시키도록 한 후 Ethilon 4-0를 이용하여 고정하였다. 수술 부위를 Vicryl Rapide (polyglactin 910; Ethicon, Somerville, NJ, USA) 4-0 및 Ethilon 4-0 봉합사를 이용해 근막, 피하층, 피부 조직 층을 맞추어 단속봉합하였다.

## 2. 신경전도검사 (NCS, Nerve Conduction Study)

신경전도검사는 수술 후 4주일이 되는 시점에 시행하였다. 신경 자극을 위하여 신경 인터페이스로부터 약 3cm근위부의 좌골신경에 2채널 커프 전극 (Nerve Cuff Electrodes; MicroProbes)을 위치시켰다. 자극 신호는 양극형 (bipolar) 신호로 1분간 12회 가하였다. 전기 자극 매개변수는 50 마이크로초( $\mu$ s)의 길이로 50  $\mu$ A, 100  $\mu$ A, 150  $\mu$ A, 200  $\mu$ A, 250  $\mu$ A, 300  $\mu$ A의 강도를 적용하였다. 신경전도의 Ground 전극은 토끼의 귀에, Reference 전극은 등의 피하층에 스테인레스 바늘을 이용하여 위치시켰다. (Figure 6, 7) 전도된 신경신호는 인터페이스 내 센서와 연결되어 있는 헤드포트로부터 30k sampling rate로 신경생리신호 증폭기판 (RHD2312; Intan Technology)을 통과 획득하였다. 신경신호는 자극을 가한 시점을 0으로 하여 전후 3000 마이크로초 ( $\mu$ s)의 각 진폭(Amplitude, mV)을 시계열 형태로 획득하였다. 이렇게 획득한 데이터를 엑셀 (Excel, Office 365, Microsoft)의 그래프를 통해 시각화하였다.

## 3. 병리조직 채취

수술 후 29주일이 되는 시점에 기존 시술부위에서 병리조직을 채취하여 조직 검사 및 검경을 시행하였다. 병리조직은 Haematoxylin & Eosin (H&E) 염색 및 Bungarotoxin, Desmin, NF200 면역형광염색을 시행하였다. 병리조직 채취는 센서 융합형 RPNI 및 정상 대퇴사두근 근육, 탈신경화 (de-neurotized) 비복근, 정상 경골신경-비복근 신경근 접합부위로부터 각각 획득하였다. 센서 융합형 RPNI 병리조직을 채취할 때는 센서, 신경, RPNI 전체가 포함되도록 박리하여 검체를 획득하였다. 검체 채취 후 수술 부위는 Vicryl 4-0 (polyglactin 910; Ethicon, Somerville, NJ, USA) 봉합사를 이용해 근막, 피하층, 피부 조직 층을 맞추어 단속봉합하였다. 병리채취가 완료된 토끼는 깨어나기 전에 이산화탄소를 이용하여 안락사를 시행하였다.

## 4. 통계 분석

각 신호 강도별 최대 신호 진폭 (peak amplitude)의 평균값을 분산분석 (Analysis of variance, ANOVA)를 통해 분석하였고 각 군간의 차이를 Tukey post hoc 검정을 통해 비교하였다. 또한 병리조직검사 중 면역 형광염색의 염색 정도 및 면적을 RPNI, 정상 대퇴사두근 근육, 탈신경화 비복근, 정상 경골신경-비복근 신경근 접합부위의 각각의

군에서 Image J 프로그램을 통해 구하였다. 각 면적 및 염색 강도를 t-test를 통해 비교하였다. 통계분석은 IBM SPSS Version 21.0 (IBM Corp., Armonk, N.Y.) 프로그램을 사용하여 시행하였으며, 통계적 유의성의 기준은 p값이 0.05 미만인 경우로 설정하였다.

### III. 결과

#### 1. 신경전도검사 결과

50  $\mu\text{A}$  에서 각 12번의 자극시 최고세기의 신호 (Peak signal)의 평균값은  $189.31 \pm 11.53 \mu\text{V}$  였으며 이는 자극 시점으로부터 평균  $171.30 \pm 5.66$  마이크로초에서 측정되었다. 같은 방식으로 측정한 100, 150, 200, 250, 300 에서의 평균 최고세기의 값은  $524.03 \pm 262.65 \mu\text{V}$ ,  $1060.09 \pm 294.65 \mu\text{V}$ ,  $3226.10 \pm 262.52 \mu\text{V}$ ,  $2585.59 \pm 253.38 \mu\text{V}$ ,  $2448.38 \pm 248.88 \mu\text{V}$  였으며 해당 피크의 자극시점으로부터 발현 시간은  $1281.48 \pm 427.88$ ,  $939.81 \pm 295.48$ ,  $713.89 \pm 251.70$ ,  $455.56 \pm 20.62$ ,  $348.15 \pm 22.59$  마이크로초 였다. 피크 신호가 발현된 시점은 50 $\mu\text{A}$ 와 비교하였을 때 다른 모든 신호들의 발현 시점이 유의하게 차이가 있었다.

평균 전도속도(NCV)는 50  $\mu\text{A}$ 에서  $0.164 \pm 0.006 \text{ mm}/\mu\text{s}$ , 100  $\mu\text{A}$ 에서  $0.112 \pm 0.011 \text{ mm}/\mu\text{s}$ , 150  $\mu\text{A}$ 에서  $0.096 \pm 0.010 \text{ mm}/\mu\text{s}$ , 200  $\mu\text{A}$ 에서  $0.056 \pm 0.003 \text{ mm}/\mu\text{s}$ , 250  $\mu\text{A}$ 에서  $0.067 \pm 0.005 \text{ mm}/\mu\text{s}$ , 300  $\mu\text{A}$ 에서  $0.099 \pm 0.010 \text{ mm}/\mu\text{s}$  으로 기록되었다. (표 1)

Figure 8 은 단일채널 센서 융합형 말초신경 인터페이스에서 12회의 자극 시도에서 획득된 신호 수치를 각 자극 강도별로 시각화 한 그래프이며, Figure 9는 모든 실험체에서의 각 시점에서 신호 수치의 평균을 시각화 한 그림이다.

분산분석 결과상 각 자극세기에 따른 피크신호의 강도에 유의한 차이가 있었다. (p-value <0.001) 50  $\mu\text{A}$ , 100  $\mu\text{A}$ , 150  $\mu\text{A}$  에서 평균 피크 신호의 강도는 200  $\mu\text{A}$ , 250  $\mu\text{A}$ , 300  $\mu\text{A}$  와 유의한 차이를 보였으며 50  $\mu\text{A}$ , 100  $\mu\text{A}$ , 150  $\mu\text{A}$  군간과 200  $\mu\text{A}$ , 250  $\mu\text{A}$ , 300  $\mu\text{A}$  군 간에는 피크 신호의 강도에 유의한 차이가 없었다. (표 2)



## 2. 조직학적 검사

Figure 10은 센서 융합형 말초신경 인터페이스의 29주 후 박리된 사진이며, Figure 11은 검체 조직 채취 후의 사진이다. Figure 12은 정상 근육조직, 탈신경화된 근육조직, 정상 신경근 접합부, 센서 융합형 말초신경인터페이스의 헤마톡실린/에오신 (H&E) 대표적 염색 결과이며 Figure 13은 동일 부위에서의 Bungarotoxin 면역형광염색 결과, Figure 14는 NF200 면역형광염색 결과이다, 그리고 Figure 15은 Vimentin 면역 형광 염색의 대표적인 예이다. 붉은색이 각각 bungarotoxin, NF200, vimentin 염색부위를 나타낸다. 표 3은 각 부위별 면역 형광염색 넓이와 강도의 평균치를 나타내고 있다. Bungarotoxin 염색에서는 탈신경근육조직에서 형광염색의 범위가 가장 작았다. 독립 t-test상 센서융합 말초신경인터페이스에서의 형광염색범위는 정상 신경근접합부의 범위와 유의한 차이를 보이지 않았으며 ( $p=0.249$ ) 탈신경근육조직과는 유의한 차이를 보였다. ( $p=0.046$ ) (Figure 16)

NF200 면역형광 염색 범위는 t-test 검정상 정상 신경근 접합부와 탈신경 근육간에 유의한 차이가 있었으며 ( $p=0.002$ ) 센서융합 말초신경인터페이스의 염색 범위와 탈신경 근육 간에도 차이가 있었다. ( $p=0.004$ ) 정상 신경근 접합부와 말초신경 인터페이스간에는 유의한 차이를 보이지 않았다. ( $p=0.297$ ) (Figure 17)

Vimentin 면역형광 염색 범위는 t-test 검정상 센서 융합 말초신경 인터페이스에서 정상근육, 탈신경근육, 정상 신경근 접합부에서 모두 유의한 차이를 보였다. ( $p<0.001$ ) (Figure 18)

## IV. 고찰

본 실험의 목적은 재생 말초신경 인터페이스에서 신경과 근육 절편 사이에 센서를 삽입함으로써 기존의 외부로부터 인터페이스로 전극을 직접 삽입하는 방식을 보완할 수 있는 센서 융합형 신경 인터페이스의 고안을 위함이었다. 본 실험을 통하여 29주에 이르는 장기간에 신경 인터페이스 모델을 안정적으로 중대동물에서 구현함으로써 신경인터페이스 작성단계에서 센서를 삽입하는 원-스테이지 수술을 통해 만든 센서 융합형 인터페이스의 생물학적 안정성을 입증할 수 있었다. 그리고 정상 신경근 접합부와 비슷한 수준의 신생 신경근접합부의 형성이 확인되었고 어느정도의 섬유화 형성에도 불구하고 신호 획득을 성공적으로 시행할 수 있었다.

이전에 신경 인터페이스 작성 단계에서 전극을 삽입하는 물질로서는 여러가지 물질들이 시도되었다. 미시간 대학교의 세더나 등이 발표한 연구에서는 스테인레스 스틸과 PEDOT (poly(3,4-ethylenedioxythiophene)) 중합체를 랫드를 이용한 소동물에서 비교한 바 있다.[4] 그러나 기존의 장기간 체내 신경 인터페이스 모델을 구현한 실험에서는 본 실험과 같은 센서 전극이 통합되지 않은 일반 신경 인터페이스 모델을 사용하였다. [2] 본 실험에서는 TATATO, DMPA 등의 새로운 중합체를 이용한 물질을 사용하였고 성공적인 결과를 얻을 수 있었다.

이 실험에서는 29주에 이르는 장기간에 신경 인터페이스 모델을 안정적으로 중대동물에서 구현했다는 점에서 상당한 의의가 있다고 볼 수 있다. 이러한 중대동물 모델을 이용한 장기간의 신경 인터페이스 실험을 진행함으로써 본래 실험의 목적 뿐만 아니라 토끼 하퇴부를 이용한 신경 인터페이스 실험 모델의 안정성에 대해서도 어느정도의 검증이 되었다고 볼 수 있다.

아세틸콜린 수용체의 발현정도를 확인할 수 있는 Bungarotoxin 면역 염색은 운동신경 말단판 (motor endplate)의 절단 및 재생 정도를 평가할 수 있다. 신경인터페이스 검체에서의 발현정도가 탈신경화 된 근육에서 비교하였을 때 유의하게 낮은 수치가 확인되었고 이것은 정상 신경근 접합부와 비교하였을 때 비슷한 수준이었으며 신경근 접합부 및 인터페이스간 서로 비교하였을 때 통계학적으로 유의한 차이가 없었다. 이는 신경이 절단된 신경근 접합부에서 재신경화 (re-innervation)가 일어나는 현상과

유사하였다.[5] 이러한 점에서 신경과 근육 사이에 센서가 위치하였음에도 재신경화된 신경근접합부가 형성되었다는 점이 입증되었다고 볼 수 있다.

또한 신경축삭 (axon)을 선택적으로 염색하게 되는 NF200 면역형광염색 결과 역시 흥미로웠다. 신경 인터페이스를 작성하기 위해 탈신경화된 근육은 정상근육에 비해 NF200 의 염색 범위가 적게 나타났으며 이는 정상 신경근 접합부와 비교하였을 때 통계학적으로 유의하게 낮았다. (그림) 또한 신경 인터페이스와 탈신경근육을 비교하였을 때 역시 통계학적으로 유의한 차이를 보였으며 이러한 점에서 역시 운동신경 말단판의 재생 뿐만 아니라 신경축삭의 재생 역시 센서 융합형 인터페이스에서 발견되었다고 확인할 수 있었다. 상기 결과들은 기존 신경 인터페이스의 재신경화를 평가했던 연구의 결과들과 일치하며[4] 정량적인 평가상 센서와 같은 이물질이 근처에 있음에도 성공적으로 신경축삭이 재생되었음을 뒷받침한다.

이렇게 신경 인터페이스와 센서가 작성단계에서 통합된 모델의 장기적 안정성이 어느정도 입증되었으므로 재생 말초신경 인터페이스의 특성상 신경 다발을 나누어 개별화 되어있는 인터페이스들을 작성 할 수 있다는 점에서 세분화되어있는 신호를 장기간 얻을 수 있는 안정적인 인터페이스로서의 기능을 확인하였다.

아직 해결해야할 점이라면 정상 조직들과 비교했을 때 많이 나온 결합조직의 양이라고 볼 수 있다. 다량의 결합조직 형성에도 불구하고 신경 전도검사에서 비교적 일관되고 안정된 결과를 얻을 수 있어 원심성 신호의 획득 매개로서의 잠재력은 충분히 확인하였다고 볼 수는 있다. 그러나 감각신경의 절단부를 통해 만든 말초신경 인터페이스를 통해 감각신호를 받아들이는 인터페이스가 가능하다는 연구 결과가 있다.[2, 6] 따라서 이 인터페이스가 감각신호, 즉 구심성 신호의 매개로도 작용 할 수 있다는 점에서 다량의 결합조직 형성이 추후 신경통 혹은 신경종 등과 같은 부작용과 연관이 되어있는지의 여부는 추가적인 실험을 통해 진행 확인되어야 할 것이다. 이러한 결합조직 형성의 이유는 본 실험에서 사용한 중합체의 물성에서 비롯되었을 가능성도 있겠으나 신경면 및 근육면과 접촉하는 부위의 면적을 조절함으로써 개선될 수 있을 것으로도 생각된다. 차후 새로운 물질을 이용한 전극과 주위 조직에 가장 최소한으로 접촉할 수 있는 형태의 전극으로 실험을 진행해 보는 것이 필요하겠다.

신경 전도검사 결과는 장기간 삽입된 센서 융합형 신경 인터페이스의 신호 획득 매개로서의 역할을 확인해 주었다. 본 실험에서는 신호 잡음 (noise)를 걸러내기 위해 고주파 (High-pass) 필터를 적용하였는데 이 필터의 역치값을 조정하면 조금더 작은 크기의 여러 자발적/비자발적 신호를 획득할 수 있지만, 해당 신호의 역치를 통해 실무용적 작동 신호를 적용할 경우 역할 할당에 있어 교란 요인으로 작용할 가능성이 있다. 따라서 역치에 오르지 못한 신호를 획득하지 못한 대신 다양한 전류량을 통한 신경 전도검사에서 200  $\mu$ A, 250  $\mu$ A, 300  $\mu$ A의 자극에서 2500~3000  $\mu$ V에 달하는 피크 신호가 확인 되었으며 NCV는 해당 유효 자극에서 55~98로 확인되었고 이는 기존 정상 토끼모델 근전도에서의 NCV와 비슷한 양상을 보였다. [7-9] 본 실험에서 자극에 사용한 전류량은 다른 실험들과 비교했을 때 상당한 차이가 있다. 일반적인 중대동물 혹은 소동물을 이용한 신경전도 실험의 경우 약 2mA에 달하는 비교적 고강도의 전류를 가하는 데 반해, 본 실험에서는 그보다 작은 전류를 사용하였다.[10, 11] 이는 신경 자극시 신경 표면 혹은 주위 조직으로의 기계적인 전도로 인한 자극잡음 (Stimulation artifact)를 걸러내기 위함이었고 비교적 작은 크기의 활동 전위를 포착 함으로서 추후 바이오닉 의지 작동 조절에 있어 세기의 세분화를 통해 조금더 다양한 역할을 할당 할 때를 대비한다는 의의도 있었다. 본실험에서는 유효한 활동 전위를 일으키지 못하는 작은 크기의 전류 (50 $\mu$ A) 에서의 피크 활동 전위를 시계열 형태의 데이터로 각각의 시점에서 획득하였고 이 시점은 모든 자극 신호에서 비슷하게 일어나는 것을 확인하였다. (표 1) 따라서 이 시점에서 포착되는 신호가 자극시 발생하는 자극잡음에 해당하는 것으로 간주하였고, 유효한 피크 활동 전위를 일으키는 200, 250, 300  $\mu$ A에서는 이보다 유의하게 긴 시점 뒤에 활동 전위가 포착 되는 것을 확인하였다. (표 1) 이를 통해 획득된 활동 전위의 경우 자극 신호 자체가 전도된 것이 아닌 유도된 근전도신호라는 것을 입증하였다. 또한 이 결과는 아주 작은 자극으로부터 발현된 세분화된 활동 전위도 효과적으로 획득 할 수 있는 센서 융합형 신경 인터페이스로서의 기능을 뒷받침 한다고 볼 수 있다.

이 실험의 한계점으로는 적은 샘플 숫자를 들 수 있다. 유선을 이용한 헤드포트를 사용해야 한다는 점에서 센서에 연결된 헤드포트가 실험체의 피부 바깥으로 돌출되어 있는 근본적인 한계점이 있어 토끼가 과격하게 움직일 경우 헤드포트를 통해 센서 전체가 끊어져버리는 현상이 종종 발생하였다. 이러한 점은 추후 신호 무선 전송과 같은 기술을 적용한다면 체외 돌출부위 없이 체내에 전체 전극부를 삽입함으로써 해결될 수

있다. 또한 추후에 신경절단부에 센서만을 삽입하는 방법 및 센서를 삽입하지 않은 재생말초신경 인터페이스와의 비교실험 역시 시행할 예정이다.

## V. 결론

본 연구는 신경 절단면과 유리 근육 사이에 센서를 삽입하여 작성한 신경 융합형 재생 말초신경 인터페이스의 장기적 생물학적 안정성과 신호 획득 매개로서의 유효성을 중대동물 모델에서 구현한 연구이다. 본 기술이 안정화 될 경우 작성 단계부터 센서를 삽입하기 때문에 추후 센서 전극 삽입시 발생할 수 있는 부작용 및 교란 요인을 최소화 하면서 신경으로부터 나오는 작은 신호를 증폭하는 재생신경 인터페이스의 장점을 극대화 할 수 있다는 점에서 추후 바이오닉 의지의 핵심 기술로서 작용할 가능성이 높다.

## VI. 참고문헌

1. Salminger, S., et al., *Hand Transplantation Versus Hand Prosthetics: Pros and Cons*. Curr Surg Rep, 2016. **4**: p. 8.
2. Navarro, X., et al., *A critical review of interfaces with the peripheral nervous system for the control of neuroprostheses and hybrid bionic systems*. J Peripher Nerv Syst, 2005. **10**(3): p. 229-58.
3. Sando, I.C., et al., *Regenerative Peripheral Nerve Interface for Prostheses Control: Electrode Comparison*. J Reconstr Microsurg, 2016. **32**(3): p. 194-9.
4. Kung, T.A., et al., *Regenerative peripheral nerve interface viability and signal transduction with an implanted electrode*. Plast Reconstr Surg, 2014. **133**(6): p. 1380-1394.
5. Vannucci, B., et al., *What is Normal? Neuromuscular junction reinnervation after nerve injury*. Muscle Nerve, 2019. **60**(5): p. 604-612.
6. Urbanchek, M.G., et al., *Development of a Regenerative Peripheral Nerve Interface for Control of a Neuroprosthetic Limb*. Biomed Res Int, 2016. **2016**: p. 5726730.
7. Piao, C., et al., *Mechanical properties of the sciatic nerve following combined transplantation of analytically extracted acellular allogeneic nerve and adipose-derived mesenchymal stem cells*. Acta Cir Bras, 2020. **35**(4): p. e202000405.
8. Johnsen, B., et al., *Amplitude, area and duration of the compound muscle action potential change in different ways over the length of the ulnar nerve*. Clin Neurophysiol, 2006. **117**(9): p. 2085-92.
9. Yokota, A., et al., *Nerve conduction and microanatomy in the rabbit sciatic nerve after gradual limb lengthening-distraction neurogenesis*. J Orthop Res, 2003. **21**(1): p. 36-43.
10. Mansiz-Kaplan, B., et al., *Median nerve conduction studies in rabbits*. BMC Neurosci, 2020. **21**(1): p. 34.
11. Castelán, F., et al., *Multiparity affects conduction properties of pelvic floor nerves in rabbits*. Brain Behav, 2018. **8**(10): p. e01105.

표 Tables

표1. 신경전도검사 결과

Stiumli	Peak voltage ( $\mu$ V)	Peak time ( $\mu$ s)	$p^*$	NCV (mm/ $\mu$ s)
50 $\mu$ A	189.31 $\pm$ 11.53	171.30 $\pm$ 5.66		0.164 $\pm$ 0.006
100 $\mu$ A	524.03 $\pm$ 262.65	1281.48 $\pm$ 427.88	0.006	0.112 $\pm$ 0.011
150 $\mu$ A	1060.09 $\pm$ 294.65	939.81 $\pm$ 295.48	0.011	0.096 $\pm$ 0.010
200 $\mu$ A	3226.10 $\pm$ 262.52	713.89 $\pm$ 251.70	0.017	0.056 $\pm$ 0.003
250 $\mu$ A	2585.59 $\pm$ 253.38	455.56 $\pm$ 20.62	<0.001	0.067 $\pm$ 0.005
300 $\mu$ A	2448.38 $\pm$ 248.88	348.15 $\pm$ 22.59	<0.001	0.099 $\pm$ 0.010

\*. 50 $\mu$ A 와 비교

표 3. 각 신호 세기별 신경전도검사상 최대 신호 크기의 통계학적 비교  
(분산분석 Tukey 사후검정)

비교주측	비교대상	평균차	p	95% 신뢰구간	
				Lower	Upper
50	100	-334.717	0.924	-1318.53	649.0945
	150	-870.784	0.116	-1854.6	113.028
	200	-3036.796	<.001	-4020.61	-2052.98
	250	-2396.278	<.001	-3380.09	-1412.47
	300	-2259.068	<.001	-3242.88	-1275.26
100	50	334.717	0.924	-649.095	1318.529
	150	-536.067	0.621	-1519.88	447.7453
	200	-2702.078	<.001	-3685.89	-1718.27
	250	-2061.561	<.001	-3045.37	-1077.75
	300	-1924.350	<.001	-2908.16	-940.539
150	50	870.784	0.116	-113.028	1854.596
	100	536.067	0.621	-447.745	1519.878
	200	-2166.012	<.001	-3149.82	-1182.2
	250	-1525.494	<.001	-2509.31	-541.683
	300	-1388.284	<.001	-2372.1	-404.472
200	50	3036.796	<.001	2052.984	4020.608
	100	2702.078	<.001	1718.267	3685.89
	150	2166.012	<.001	1182.2	3149.824
	250	640.518	0.422	-343.294	1624.329
	300	777.728	0.21	-206.084	1761.54
250	50	2396.278	<.001	1412.466	3380.09
	100	2061.561	<.001	1077.749	3045.373
	150	1525.494	<.001	541.6825	2509.306
	200	-640.518	0.422	-1624.33	343.2941
	300	137.211	0.999	-846.601	1121.022
300	50	2259.068	<.001	1275.256	3242.879
	100	1924.350	<.001	940.5385	2908.162
	150	1388.284	<.001	404.472	2372.096
	200	-777.728	0.21	-1761.54	206.0836
	250	-137.211	0.999	-1121.02	846.6013



표 4. 면역 형광염색 범위 분석

	염색 범위 (%)		
	Bungarotoxin	NF200	Vimentin
정상근육	6.50 ± 1.45	5.95 ± 3.68	2.87 ± 0.93
탈신경 근육	5.96 ± 0.89	2.21 ± 1.23	2.90 ± 0.73
정상 신경근접합부	12.78 ± 1.81	16.71 ± 4.37	7.22 ± 1.64
센서 융합형 RPNI	10.81 ± 0.89	20.26 ± 4.56	21.90 ± 1.79

## 그래프 및 그림

Figure1. 토끼 좌골신경 박리 - 무릎 외측부터 상전장골극 (ASIS)을 잇는 선 상에 3cm 가량 절개를 가하고 대퇴이두근 및 외측 광근 사이 격막을 박리하여 좌골신경 및 분지 (경골신경, 비골신경, 비복신경)를 박리한다

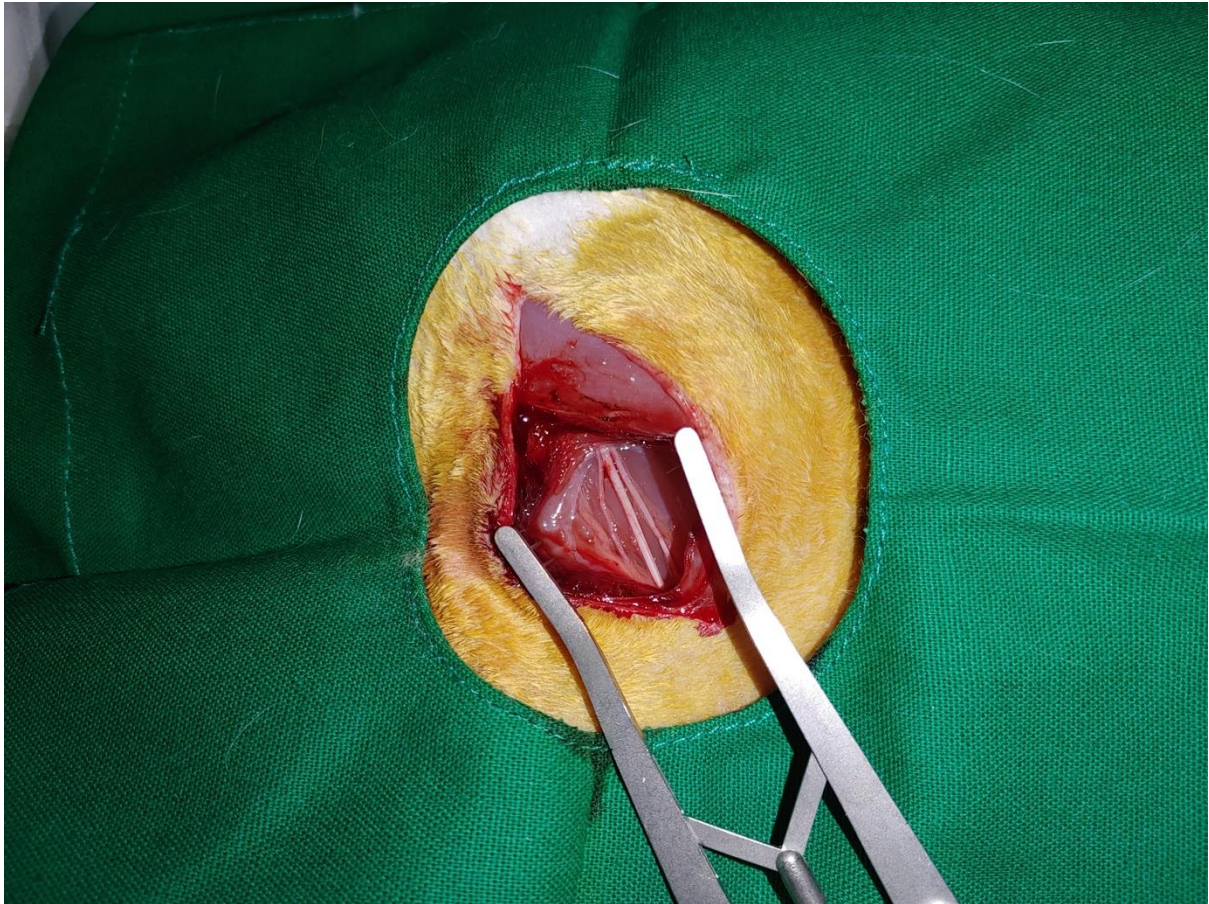


Figure 2. 근육절편의 획득

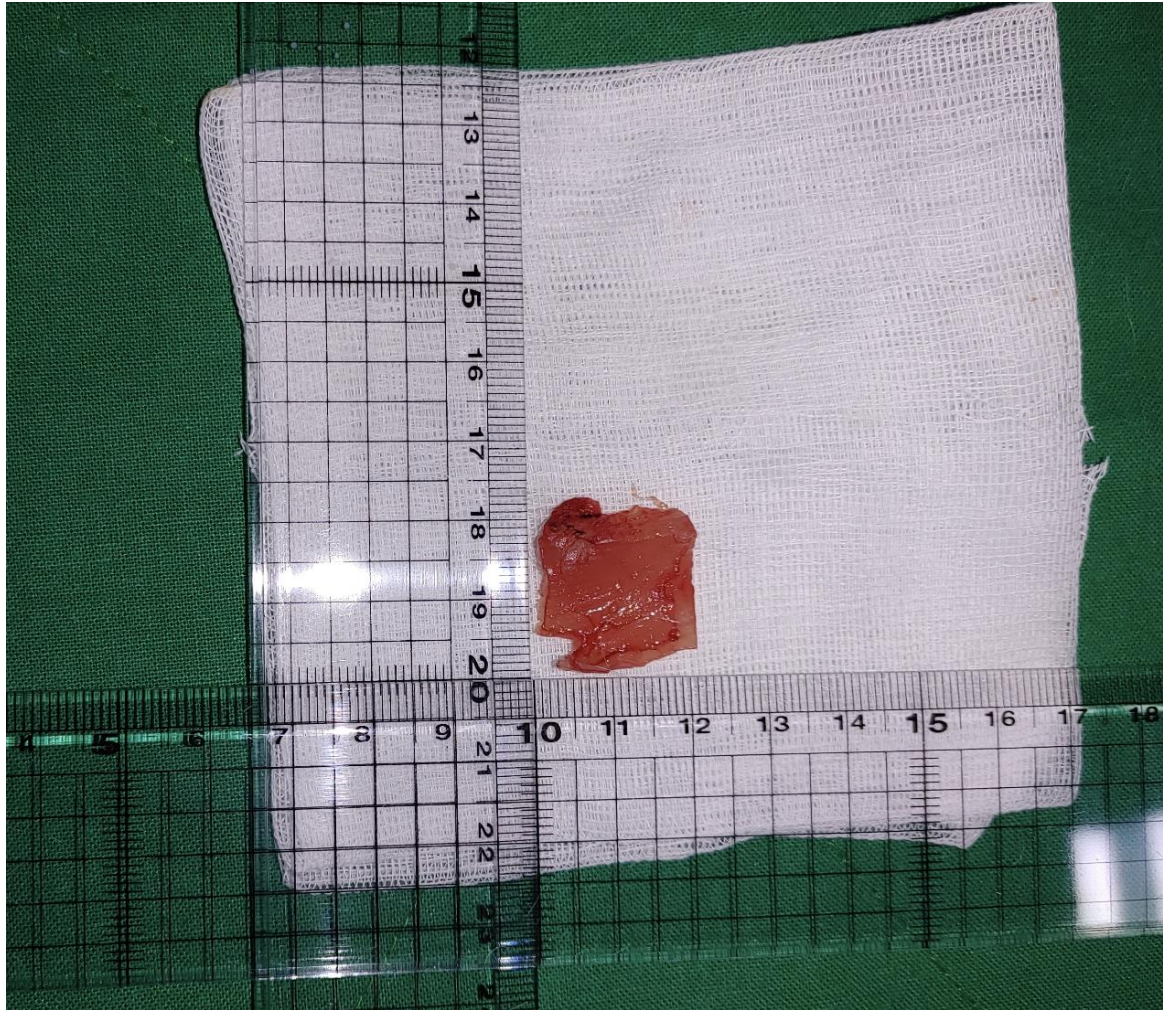


Figure 3. 신경과 근육 절편 사이에 센서를 삽입함으로써 센서 융합형 재생 말초신경 인터페이스를 작성

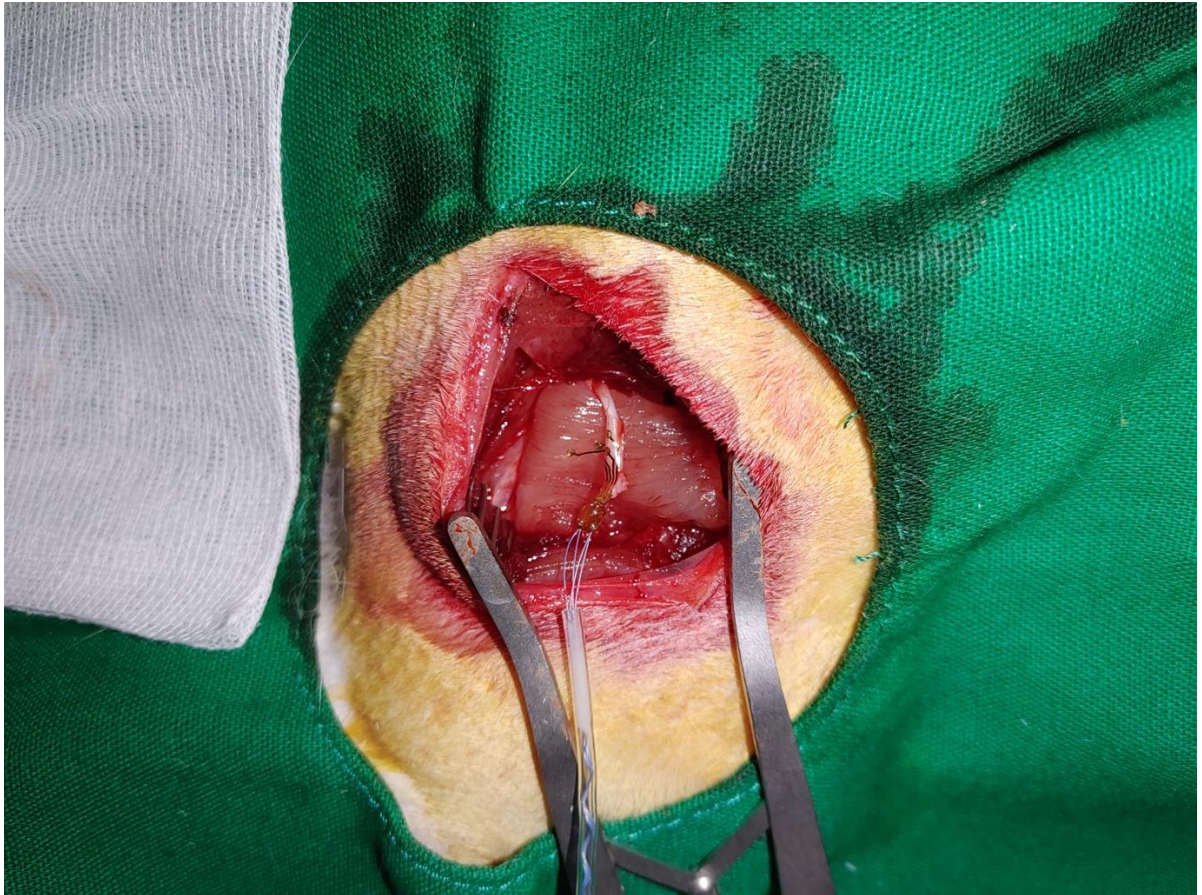


Figure 4. 작성이 완료된 센서 융합형 재생 말초신경 인터페이스



Figure 5. 토끼의 후두부로 빠져나와 있는 헤드포트의 모습



Figure 6. 신경전도검사 전체 모식도

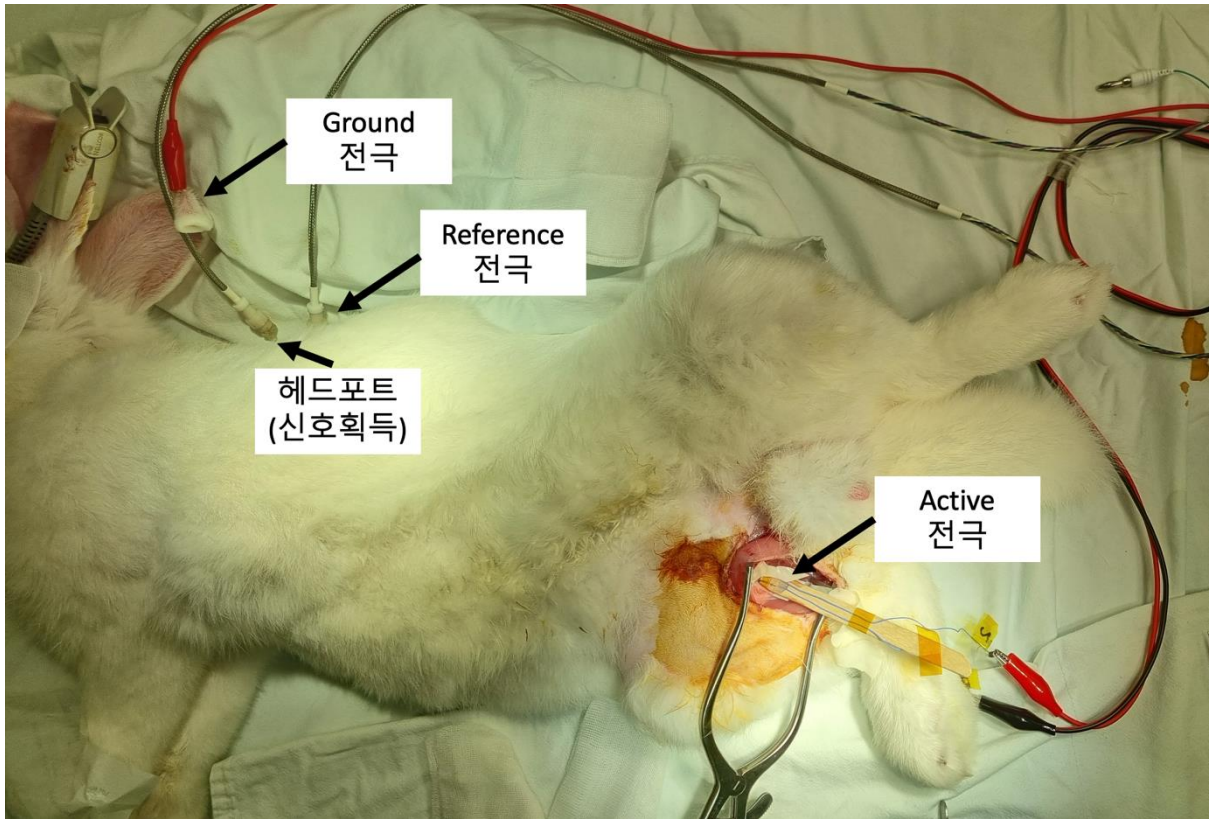


Figure 7. 근위부 좌골신경에 자극용 hook을 위치한 모습

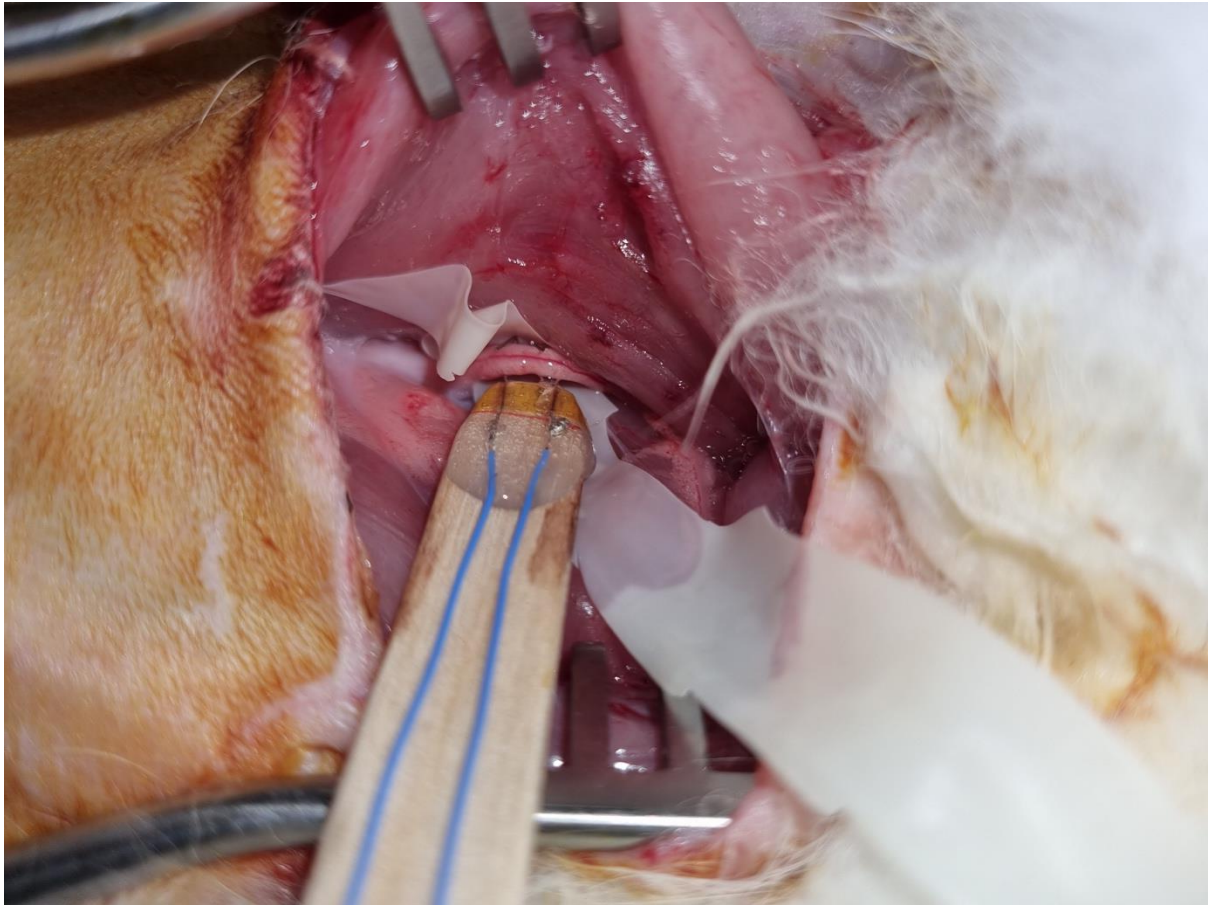




Figure 8. 각 자극 세기별 12회의 신경전도검사 자극시의 파형 전체를 표현한 그래프의 예시

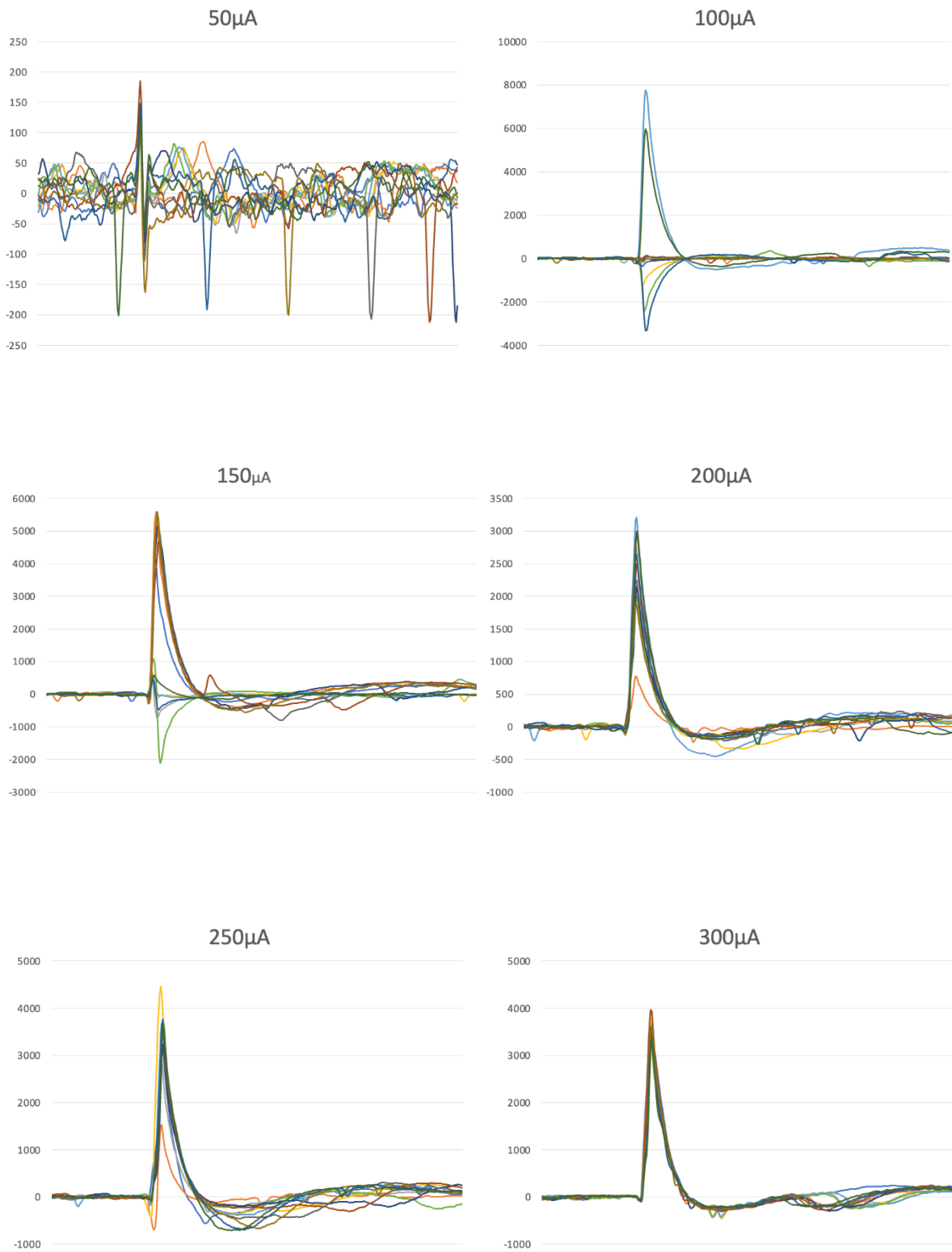


Figure 9. 각 시점별 평균값을 이용한 신경전도검사 그래프

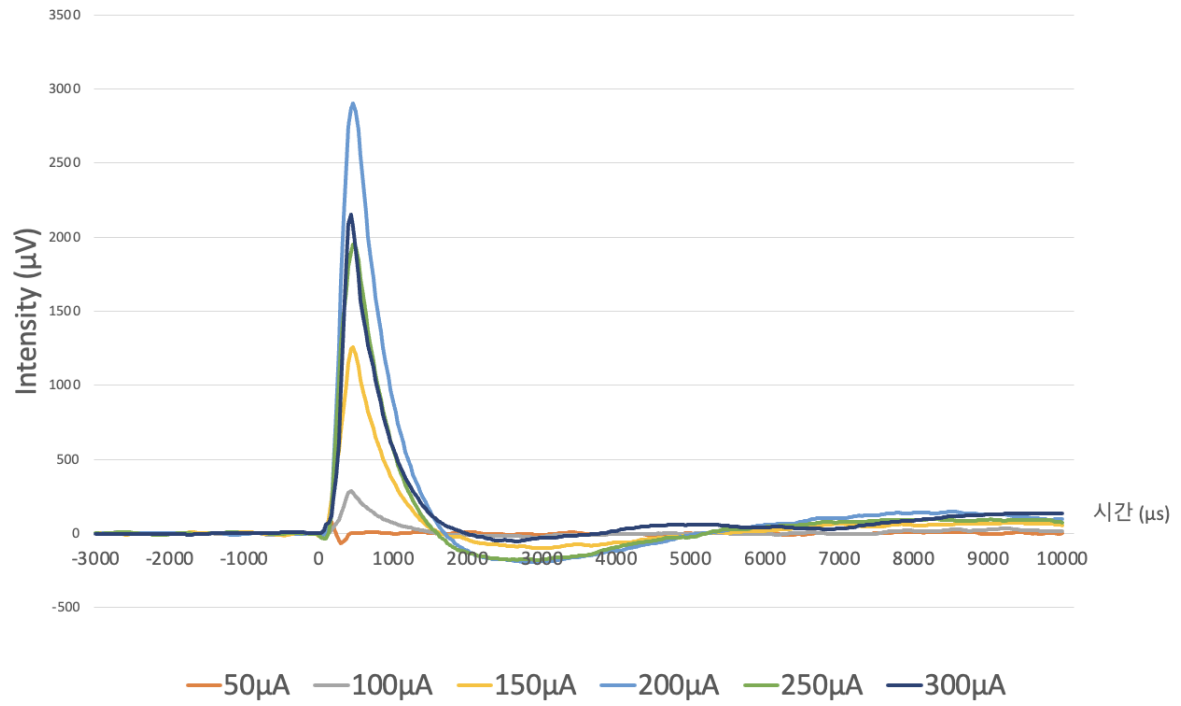


Figure 10. 29 주 후 박리된 센서 융합형 재생 말초신경 인터페이스

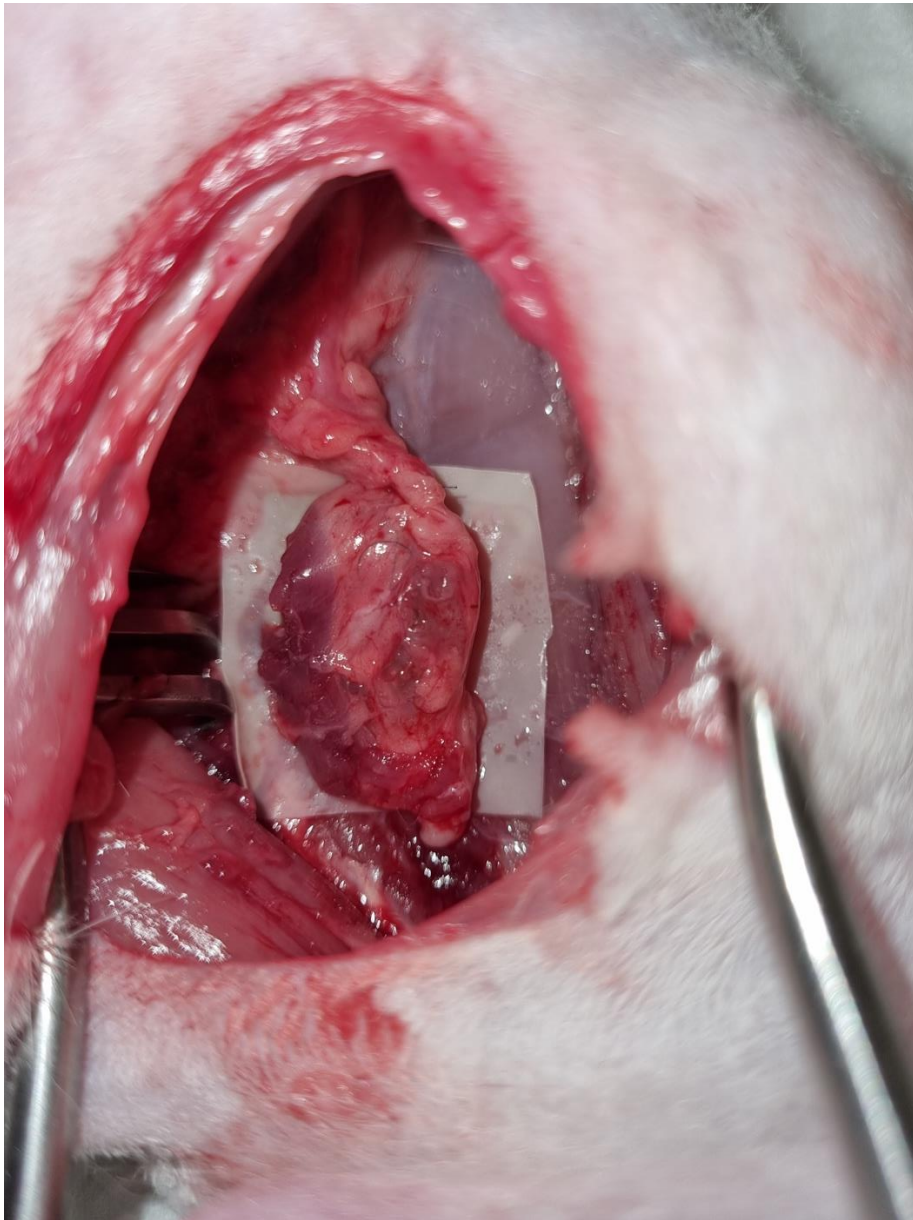


Figure 11. 채취된 센서 융합형 재생 말초신경 인터페이스의 모습



Figure 12. H & E 염색결과 (40배율) 좌상: 정상근육 우상: 탈신경근육  
좌하: 정상신경근접합부 우하: 센서융합신경인터페이스

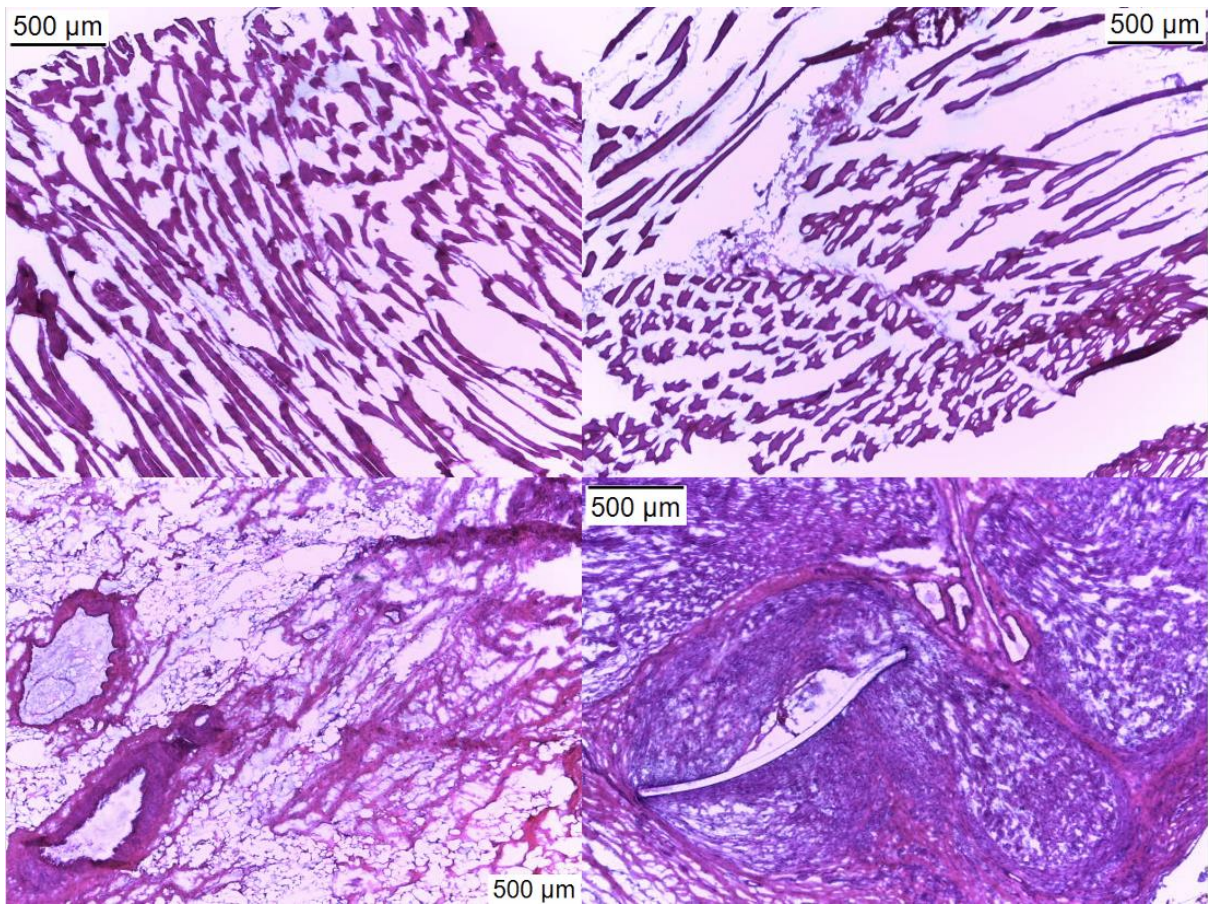


Figure 13. Bungarotoxin 면역형광염색 결과 (28배율), 좌상: 정상근육  
우상: 탈신경근육 좌하: 정상신경근접합부 우하: 센서융합신경인터페이스

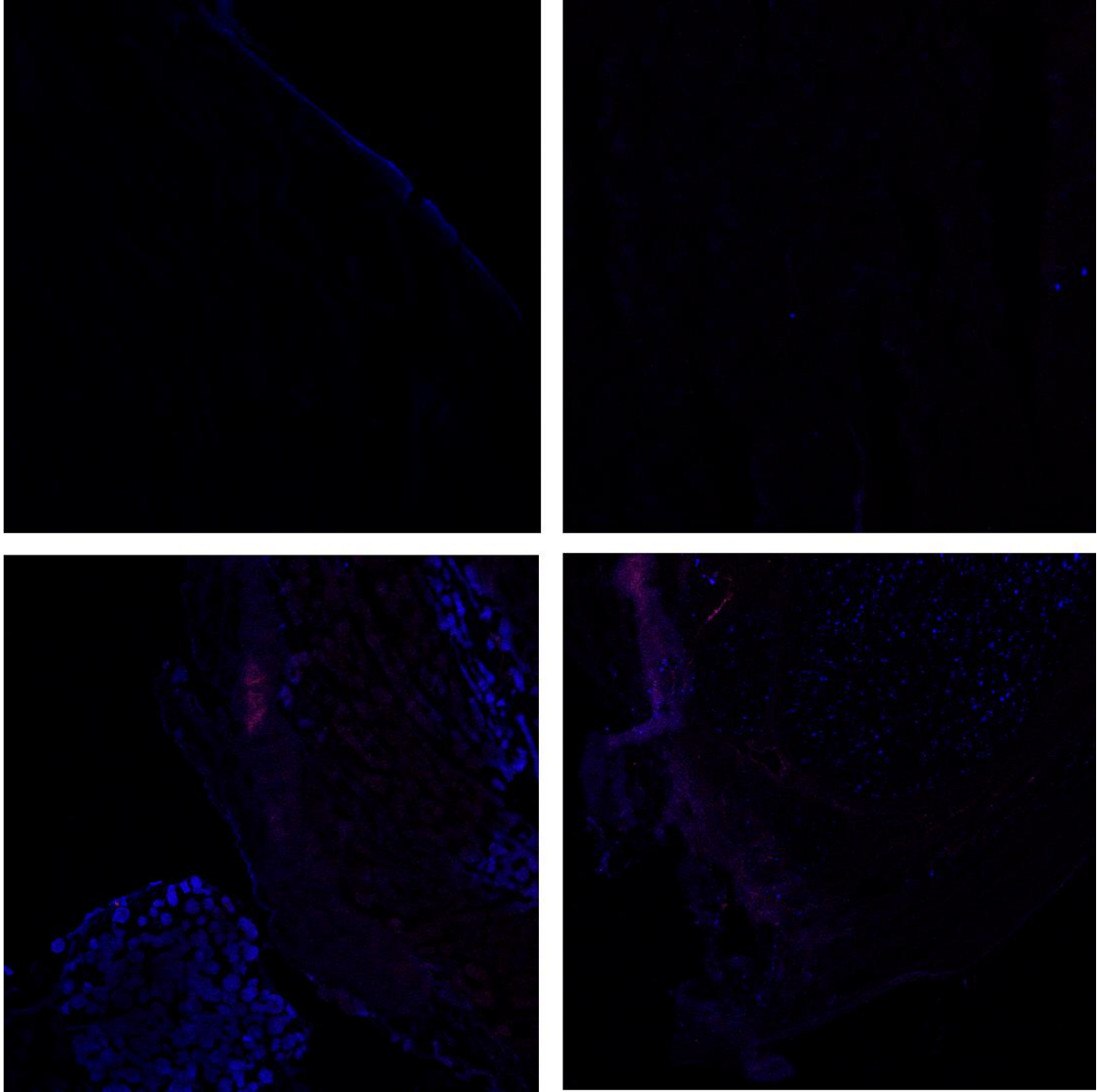


Figure 14. NF200 면역형광염색 결과 (40배율), 좌상: 정상근육 우상: 탈신경근육 좌하: 정상신경근접합부 우하: 센서융합신경인터페이스

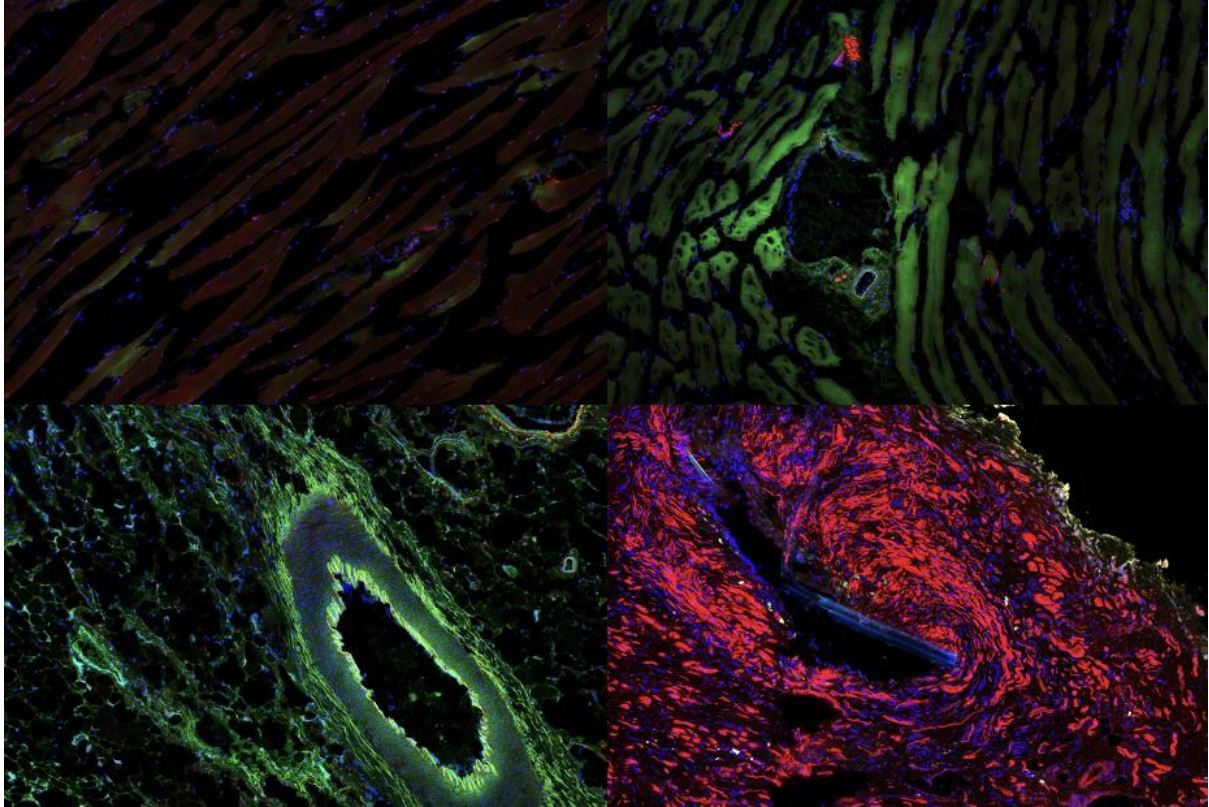


Figure 15. Vimentin 면역형광염색 결과 (40배율), 좌상: 정상근육 우상: 탈신경근육 좌하: 정상신경근접합부 우하: 센서융합신경인터페이스

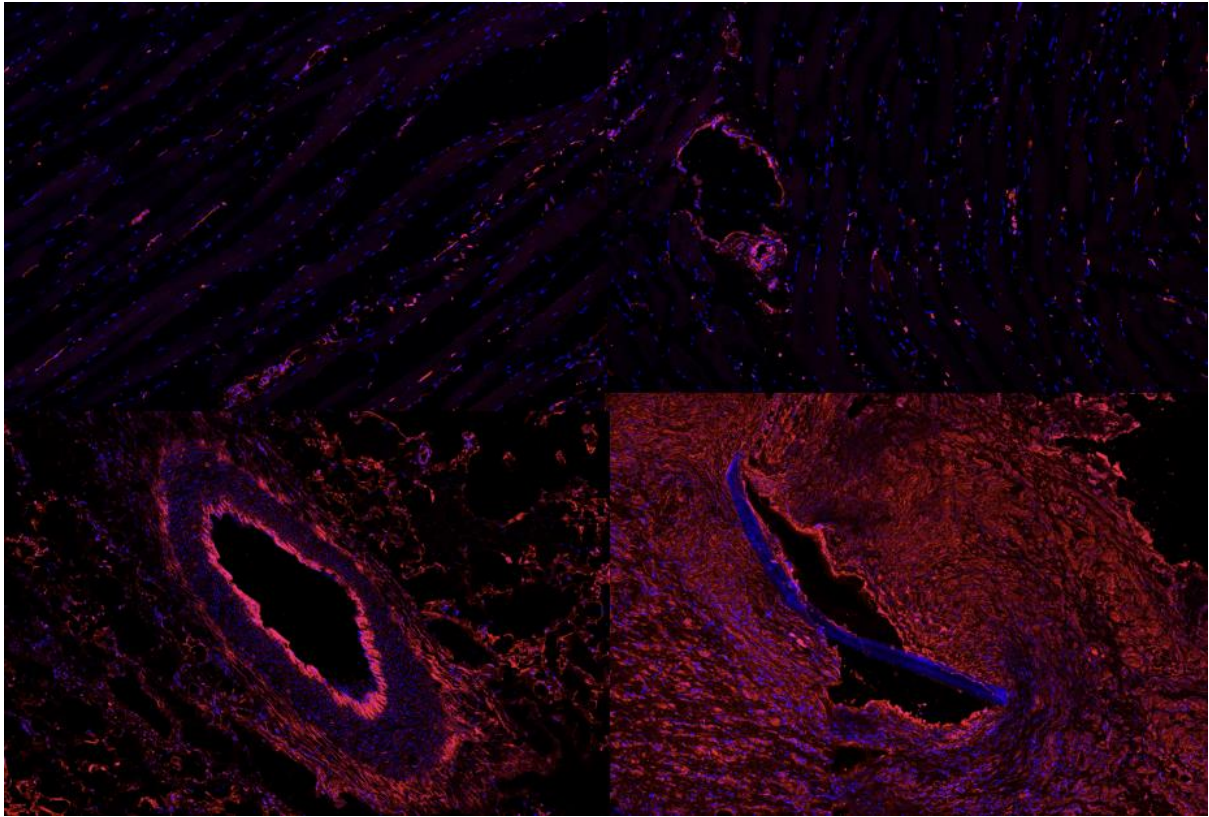




Figure 16. Bungarotoxin 면역염색 부위의 정량적 분석 결과

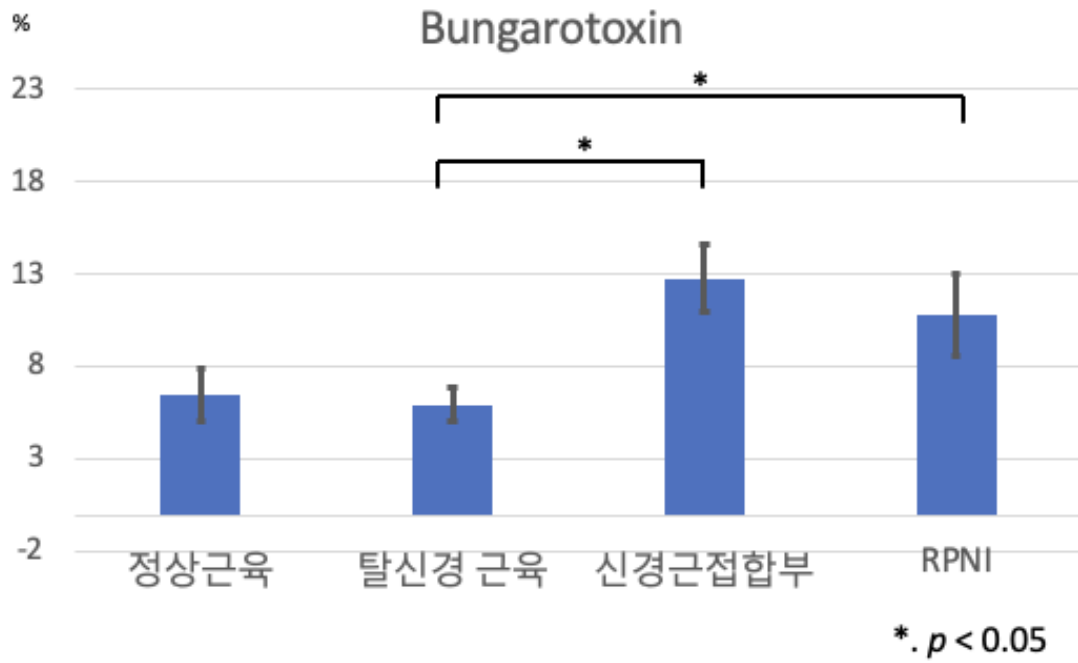


Figure 17. NF200 면역염색 부위의 정량적 분석 결과

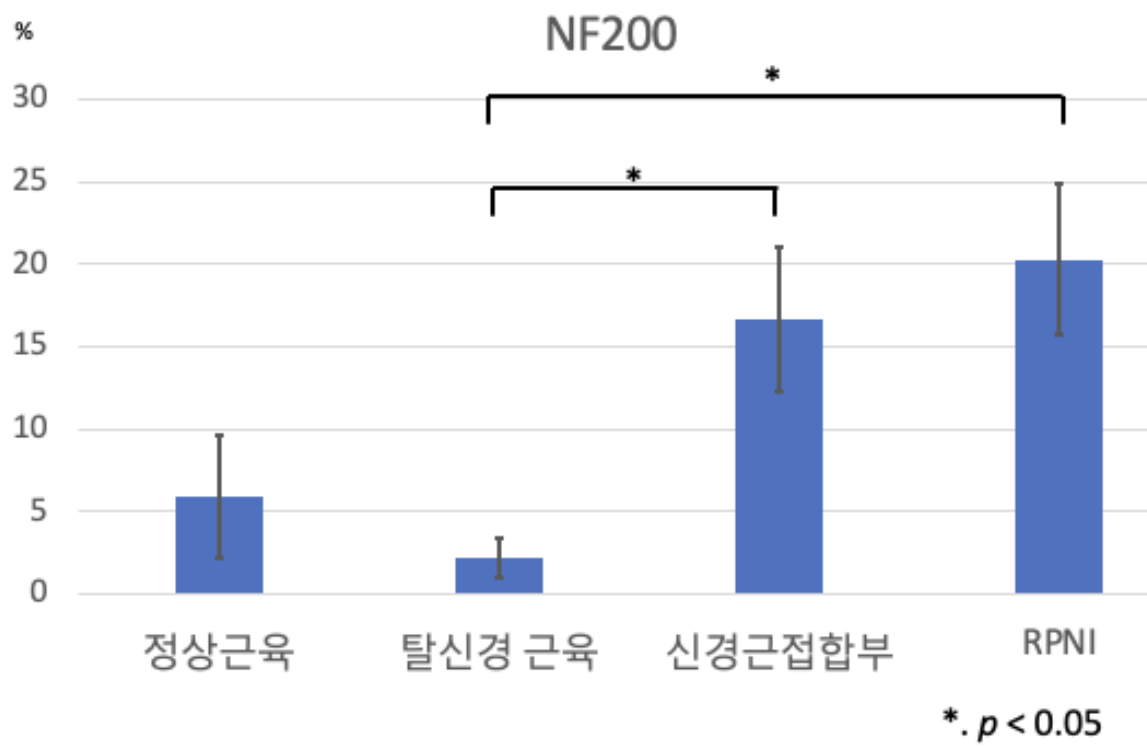
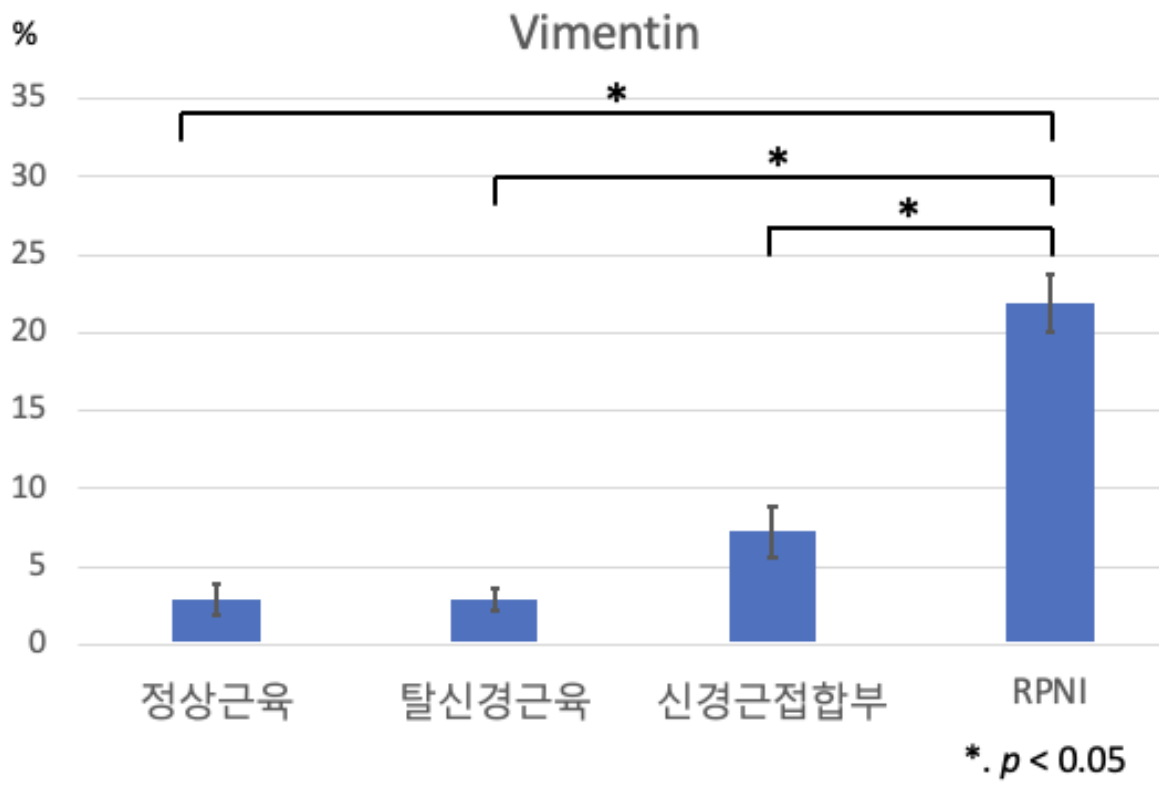


Figure 18. Vimentin 면역염색 부위의 정량적 분석 결과



## 영문 요약

### Purpose

Amputation surgery occurs for various reasons, with common causes including trauma, coronary artery disease, and complications of diabetes. The frequency of amputation surgeries is increasing due to the growing elderly population and the spread of chronic diseases, particularly with a steady rise in lower limb amputations due to diabetes. Currently, treatment options for limb amputation patients can be divided into two choices: surgery and prosthetics application. Among these, prosthetic technology has significantly improved, surpassing the drawbacks of homologous transplantation surgery and even reaching a level of fine adaptation. However, for bionic prosthetics to fully replace the function of amputated limbs, intuitive control is essential, requiring precise detection of the user's intentions and effective transmission of these detected movements to the prosthetic machinery. Regenerative Peripheral Nerve Interface (RPNI) surgery is recently studied with a relatively straightforward method that involves securing a non-vascularized muscle graft to the end of a severed nerve, and it has been successful in operating robotic prosthetics through this interface in various studies conducted at the University of Michigan. Nevertheless, effective signal acquisition still typically involves using a relatively invasive method of inserting electrodes directly from the outside through pre-established neural interfaces. In this study, we aim to create a sensor-integrated neural interface by inserting sensors during the neural interface fabrication process, and we seek to confirm its long-term biological stability, degree of reinnervation, and potential as an interface for acquiring efferent signals through neurophysiological testing.

### Methods

The experiment was conducted using a total of five New Zealand White (NZW) rabbits weighing between 3.0 and 3.3 kilograms as subjects.

#### 1. Creation of Sensor-Integrated Neural Interface Model

A surgical procedure was carried out on the rabbits' hind limbs, starting from the upper knee area to approximately 3 cm in front of the Anterior Superior Iliac Spine (ASIS)

on the outer thigh. After sufficient dissection both anteriorly and posteriorly, the deep fascia was opened, and the intermuscular septum between the biceps femoris muscle and the vastus lateralis muscle was dissected to expose the sciatic nerve. Subsequently, dissection was performed from the distal end of the sciatic nerve to the point where the tibial nerve, peroneal nerve, and sural nerve branch.

## 2. Electrophysiological Testing

Nerve conduction tests were conducted twice at 4 weeks after surgery. For nerve stimulation, two-channel cuff electrodes (Nerve Cuff Electrodes; MicroProbes) were placed approximately 3 cm proximal to the sensor-integrated neural interface on the sciatic nerve. Stimulation signals were applied in a bipolar manner, with 12 repetitions lasting for 1 minute. Electrical stimulation parameters included pulse width of 50 microseconds ( $\mu\text{s}$ ) with intensities of 50  $\mu\text{A}$ , 100  $\mu\text{A}$ , 150  $\mu\text{A}$ , 200  $\mu\text{A}$ , 250  $\mu\text{A}$ , and 300  $\mu\text{A}$ .

## 3. Histologic evaluation

At 29 weeks post-operative period, tissue samples were harvested from the surgical site, and histological examination and staining were performed. Pathological tissues underwent Hematoxylin & Eosin (H&E) staining as well as Bungarotoxin, Desmin, and NF200 immunofluorescence staining. Tissue samples were obtained from the sensor-integrated RPNI, normal quadriceps femoris muscle, denervated gastrocnemius muscle, and normal neuromuscular junction between tibial nerve and gastrocnemius muscle, respectively.

### Statistical Analysis

The average peak amplitude of the maximum signal strength for each signal intensity was analyzed using Analysis of Variance (ANOVA), and differences between groups were compared using Tukey post hoc tests. Additionally, during immunofluorescence staining in pathological tissue examination, the staining intensity and area for each group in the RPNI, normal quadriceps femoris muscle, denervated gastrocnemius muscle, and normal tibial nerve-denervated gastrocnemius muscle junction were

measured using the Image J program. Comparisons of each area and staining intensity were conducted using t-tests. Statistical analysis was performed using IBM SPSS Version 21.0 (IBM Corp., Armonk, N.Y.), with a significance level set at  $p < 0.05$ .

## Results

### 1. Nerve Conduction Test Results

According to the results of the analysis of variance (ANOVA), there was a significant difference in the strength of peak signals based on each stimulus intensity ( $p$ -value  $< 0.001$ ). The average peak signal strength at 50  $\mu\text{A}$ , 100  $\mu\text{A}$ , and 150  $\mu\text{A}$  showed a significant difference compared to 200  $\mu\text{A}$ , 250  $\mu\text{A}$ , and 300  $\mu\text{A}$ . However, there was no significant difference in peak signal strength between the 50  $\mu\text{A}$ , 100  $\mu\text{A}$ , and 150  $\mu\text{A}$  groups and the 200  $\mu\text{A}$ , 250  $\mu\text{A}$ , and 300  $\mu\text{A}$  groups.

### 2. Histological Examination

In Bungarotoxin staining, the fluorescence staining range was the smallest in denervated muscle tissue. In an independent t-test, the fluorescence staining range in the sensor-integrated peripheral nerve interface did not show a significant difference from the range in normal nerve-muscle junctions ( $p=0.249$ ) but did show a significant difference from denervated muscle tissue ( $p=0.046$ ).

The range of NF200 immunofluorescence staining showed a significant difference between normal neuromuscular junctions and denervated muscle tissue ( $p=0.002$ ) also between the staining range in the sensor-integrated peripheral nerve interface and denervated muscle tissue ( $p=0.004$ ). There was no significant difference between normal neuromuscular junctions and the peripheral nerve interface ( $p=0.297$ ).

Vimentin immunofluorescence staining range showed a significant difference in the sensor-integrated peripheral nerve interface compared to normal muscle, denervated muscle, and normal neuromuscular junctions ( $p < 0.001$ ).

## Conclusions

This study represents the implementation of a long-term biological stability and effectiveness of signal acquisition mediator for a sensor-integrated regenerative peripheral nerve interface, created by inserting sensors between the nerve end and the free muscle in a large animal model. If this technology stabilizes, it has the potential to serve as a core technology for future bionic prosthetics. This is because, from the initial creation stage, the insertion of sensors minimizes potential side effects and disruptions that may arise during sensor electrode insertion. Moreover, it maximizes the advantages of a regenerative nerve interface by amplifying small signals originating from the nerves.