



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

랫드 실험을 통한 절단 신경 말단에서
재생 말초 신경 인터페이스의
(Regenerative peripheral nerve interface)
효용성 연구

Electrophysiological Signal Validation of
Regenerative Peripheral Nerve Interface at
Nerve Ending: A Rat Model

울 산 대 학 교 대 학 원

의 학 과

조 정 목

랫드 실험을 통한 절단 신경 말단에서
재생 말초 신경 인터페이스의
(Regenerative peripheral nerve interface)
효용성 연구

지도교수 홍준표

이 논문을 의학석사 학위 논문으로 제출함

2020년 12월

울산대학교 대학원

의학과

조정목

조정목의 의학석사 학위 논문을 인준함

심사위원 홍 준 표 (인)

심사위원 최 종 우 (인)

심사위원 서 현 석 (인)

울 산 대 학 교 대 학 원

2020 년 12 월

차 례

국문요약.....	1
표차례.....	4
그림차례.....	5
서론.....	6
재료 및 방법.....	8
결과.....	12
고찰.....	14
결론.....	18
참고문헌.....	19
표.....	20
그림.....	24
영문요약.....	40

국 문 요 약

연구 목적

교통사고 및 다양한 스포츠 활동, 서구화 및 고령화로 만성질환 이환율이 올라가면서 사지 말단 절단 유병율은 급격하게 증가하고 있다. 절단 환자는 사회적, 심리적으로 고립되면서 회복 및 재활에 커다란 사회적 비용을 야기한다. 현존하는 말단 절단 환자의 보철은 많은 발전을 이루어 왔으나 이식 혹은 착용 후 실제로 사용하는데 있어서 재활치료 및 꾸준한 트레이닝의 필요성 등 각종 한계를 보이고 있다. 말단 절단 환자는 기능적 상실뿐만 아니라 신경종 형성으로 인한 신경통, 사지 상실에 대한 우울감 등 정신적인 문제로도 장기간 고통받는다. 이에 대한 근본적인 해결책으로 로봇 사지에 대한 적극적인 연구가 각국에서 진행 중이다.

로봇 사지는 정교한 움직임을 구현하기 위해 척수, 말단신경, 근육까지의 자연스러운 전기신호 제어가 필수적이다. 착용형 로봇은 이식정보다 재활 및 사용이 간편하지만 피부 표면에서 신경 말단의 전기신호를 받아들이는 모델을 구현하는데 어려움이 있어 여러가지 연구가 활발히 진행 중이다. 기존 연구들을 통해 우리는 말초 신경 신호가 말단에서 생체학적으로 증폭이 되어 근전도 신호로 변환된다는 것을 알고 있으며 이를 제대로 기록하고 제어할 수 있다면 상하지 로봇의 직관적 컨트롤이 가능할 것으로 기대하고 있다. 이를 위해 신경 말단에 근육세포를 이식하여 재생 말초 신경 인터페이스(Regenerative peripheral nerve interface, RPNI)를 형성하여 신경 신호를 증폭시키는 기술이 최근 각광받고 있다.

본 연구의 목적은 RPNI의 과학적 근거를 랫드를 이용한 신경신호검사를 통해 입증하는 것이다. 더 나아가 그 효과를 단순 절단 모델의 신호와 비교하고 신경신호 증폭 및 절단 환자의 신경 인터페이스 개발에 대한 과학적 근거를 제공하고자 한다.

연구 방법

총 24마리의 Lewis 랫드 (8주령)을 4군으로 나누었다.

1 군 : 대조군 - 좌골신경 박리외에 다른 술기를 시행하지 않은 군

2 군 : 단순 신경 절단 모델 - 총비골신경 절단만을 시행한 군

3 군 : 신경 인터페이스 모델 - 총비골신경 절단 후 대퇴이두근(biceps femoris) 일부를 이용해 재생 말초 신경 인터페이스(RPNI)를 한 개 만든 군

4 군 : 신경 인터페이스 모델 - 총비골신경 절단 후 대퇴이두근(biceps femoris) 일부를 이용해 재생 말초 신경 인터페이스(RPNI)를 두 개 만든 군

1. 랫드의 신경 인터페이스 모델 생성

랫드의 뒷다리에 고관절부터 치골결합까지 이어지는 3cm 길이의 절개를 시행하였다. 심부근막을 열고 대퇴이두근과 대둔근 사이를 박리하여 그 사이에서 비골신경을 박리하였다. 이후 비골신경 말단에 2, 3, 4군에 해당하는 수술을 시행하였다. 1군의 랫드는 해당 신경을 확인한 후 전기생리학적 검사만을 시행한 후 검사결과를 기록하였다.

2. 1차 전기생리학적 검사

신경 인터페이스 모델 생성 직후 좌골신경을 자극하여 랫드의 앞다리 근육 혹은 생성된 신경인터페이스에 TECA Synergy (Viasys healthcare, UK)를 이용해 근전도검사와 신경전도검사를 시행하였다. 검사 시행 후 수술 부위를 Vicryl Rapide (polyglactin 910; Ethicon, Somerville, NJ, USA) 4-0 봉합사를 이용해 각 층을 맞추어 봉합하였다.

3. 2차 전기생리학적 검사

수술 후 2주일이 되는 시점에 비침습적 전기생리학적 검사를 한차례 시행하였다. 랫드의 앞다리 근육에 바늘을 꽂아 근전도검사를 시행하여 시간 당 비정상 자발전위 숫자를 구해 결과를 도출하였다.

4. 3차 전기생리학적 검사

수술 후 4주일이 되는 시점에 기존 수술부위를 다시 절개하였다. 비골신경 말단 혹은 신경인터페이스 수술 부위를 노출시킨 후 랫드의 앞다리 근육 혹은 신경인터페이스에 근전도검사와 신경전도검사를 시행하였다. 검사결과를 기록하여 1차, 2차 검사결과와 비교하였다. 수술 부위는 첫 수술과 동일한 방법으로 봉합하였다.

5. 병리조직 채취

신경인터페이스에서 병리조직을 채취하여 조직 검사 및 검경을 시행하였다.

6. 통계 분석

각 그룹 간 검사결과 유의한 차이가 있는지 확인하기 위해 대응표본t검정으로 p-value를 확인하였다. 추가적으로 다그룹간 평균 비교를 위해서는 비모수 검정법인 독립 K 표본(Kruskal-Wallis test) 통계법을 사용하였다.

결과

1. 신경전도검사 결과의 비교

각 군별 수술 직후 신경전도검사의 잠복기 평균은 1군이 1.55 ± 0.07 ms, 2군이 3.62 ± 1.54 ms, 3군이 2.24 ± 1.06 ms, 4군이 2.18 ± 1.29 ms 이었다. 신경 신호 진폭의 평균은 1군이 14.12 ± 5.30 mV, 2군이 2.76 ± 2.78 mV, 3군이 4.21 ± 2.33 mV, 4군이 5.78 ± 3.13 mV 이었다.

수술 시행 4주 후 재시행한 신경전도검사의 잠복기 평균은 1군이 1.59 ± 0.25 ms, 2군이 3.04 ± 0.26 ms, 3군이 2.96 ± 0.68 ms, 4군이 2.93 ± 0.24 ms 이었다. 신경 신호 진폭의 평균은 1군이 17.32 ± 8.87 mV, 2군이 4.64 ± 1.41 mV, 3군이 8.23 ± 2.99 mV, 4군이 8.13 ± 2.31 mV 이었다.

2. 근전도검사 결과의 비교

수술 시행 2주 후 시행한 근전도검사에서 5초 당 비정상 자발전위의 발생횟수 평균은 2군이 3.25 ± 1.49 회, 3군이 3.75 ± 2.12 회, 4군이 3.50 ± 2.39 회 이었다. ($p=0.842$)
수술 시행 4주 후 시행한 근전도검사에서 5초 당 비정상 자발전위의 발생횟수 평균은 2군이 9.38 ± 4.44 회, 3군이 4.75 ± 2.25 회, 4군이 3.50 ± 1.60 회 이었다. ($p=0.138$)

3. 병리조직 검사 결과

수술 후 4주 뒤 채취한 신경인터페이스 병리조직에서 근육세포와 신경세포가 섞여서 존재하는 것이 확인되었으며 신경세포 쪽으로 신생혈관증식 소견이 관찰되었다.

결론

본 연구는 신경 말단에서 근육 이식절편을 이용해 만든 재생 말초신경 인터페이스를 동물실험에서 입증한 몇 안되는 연구 중 하나로, 활발하게 진행되고 있는 신경 인터페이스 연구들의 선행연구로 역할을 할 수 있을 것으로 기대한다. 재생 말초 신경 인터페이스는 신경말단의 재신경화를 유도하고 신호를 증폭할 수 있다는 점에서 추후 바이오닉 림과 절단 말단의 연결에 유용한 도구로 사용될 수 있다. 다만 선행된 임상 연구가 거의 없는 상황에서 실제 임상에서 동일한 효과를 나타낼 수 있을지는 추가 연구가 필요한 부분이다.

표 차례

Table 1. 군별 시행된 실험 과정

Table 2. 신경 전도 검사 결과

Table 3. 신경 전도 검사 결과 잠복기와 진폭 변화의 통계학적 비교

Table 4. 근전도 검사 결과

그림차례

Figure 1. 신경인터페이스 모델 형성 수술 디자인

Figure 2. 좌골신경 박리 (1군)

Figure 3. 비골신경 절단 (2군)

Figure 4. 재생 말초신경 인터페이스(RPNI)를 한 개 시행한 군 (3군)

Figure 5. 재생 말초신경 인터페이스(RPNI)를 두 개 시행한 군 (4군)

Figure 6. 신경전도검사 시행 모식도

Figure 7. 각 군의 신경전도검사 Active 부착 부위

Figure 8. 근전도검사 시행 모식도

Figure 9. 근전도검사에서 도출되는 비정상 자발전위

Figure 10. 신경전도검사 결과 군별 비교 그래프

Figure 11. 신경전도검사 - 각 군별 잠복기 비교 그래프

Figure 12. 신경전도검사 - 각 군별 진폭 비교 그래프

Figure 13. 신경전도검사 군별 대표 예제.

Figure 14. 근전도검사 결과 군별 비교 그래프

Figure 15. 근전도검사 군별 대표 예제

Figure 16. 병리조직결과 H&E

I. 서론

교통사고 및 다양한 스포츠 활동, 서구화 및 고령화로 만성질환 이환률이 올라가면서 말단 절단 유병률은 급격하게 증가하고 있다. 미국에서는 한해에 약 185,000명, 국내에서는 1000명이 넘는 환자에서 주절단(Major amputation)이 일어나고 있다. 사지 절단 환자는 스스로 사회적, 심리적으로 고립되면서 커다란 사회적 비용을 야기한다. 이를 극복하기 위해 다양한 방법의 보철이 환자에게 적용되고 현재까지의 보조기는 착용 및 활용이 자유롭지 못하다는 점에서 그 한계가 명확하다. 이에 대한 해결책으로 로봇사지에 대한 적극적인 연구가 각국에서 진행 중이다.

로봇팔이나 로봇다리는 정교한 움직임 구현을 위해 척수, 말단신경, 근육까지의 자연스러운 폐루프(closed-loop) 제어가 필요하다. 이를 위해 진행된 기존 연구들은 신경 말단에 재생 말초신경 인터페이스(Regenerative Peripheral Nerve Interface, RPNI)를 만들어주면 생체학적으로 증폭된 신경전도 신호를 유발할 수 있다는 것을 밝혀내었다. 미시간대 그룹에서 RPNI를 시행한 랫드 모델에서 복합근활동전위를 발견해 해당 인터페이스가 유의한 신경신호를 가진다는 것을 입증했으며[1, 2] 랫드를 일정 범위 안에서 걷게 만들어 주기적으로 나타나는 RPNI의 신호를 잡아내는 실험도 진행하였다.[3] 다방면의 전임상연구로 RPNI의 가능성 및 신호 증폭 능력이 차례로 입증되었으며 이는 새로운 임상연구들의 기초자료로 활용되고 있다.

RPNI의 임상적인 효과는 크게 두가지로 나뉘는데 첫번째는 사지 절단 후 환상통을 포함한 통증을 유의하게 감소시키는데 있으며[4, 5] 이를 위해 RPNI를 시도하는 경우가 점점 늘어나고 있다. 두번째 목적인 신경말단에서의 신호 증폭 및 전달은 선행 연구가 거의 없다시피 하며, 가장 최근에 상지 절단 환자들에게서 RPNI를 이용해 로봇 팔을 연결해 특정 동작에서 생성되는 근전도신호를 잡아낸 것을 시작으로[6, 7] 다방면의 연구가 진행 중이다. RPNI가 신경말단에서 근전도신호를 증폭시키는 것을 착안하였고 증명해냈으며, 이는 이후 착용형 로봇다리, 혹은 로봇팔에서 해당 신호를 인식하여 움직일 수 있도록 하는 과도기적 기술인 것이다.

인간과 로봇의 결합은 21세기 가장 각광받는 분야 중 하나로 세계 우수 연구팀이 활발하게 연구를 진행하는 가운데 국내 연구팀의 실적은 미미한 것이 사실이다. 실제 사람에게 바이오닉 림을 적용하려면 RPNI가 실제로 신경말단에서 어떤 식으로 발현하는지, 그 전기생리학적 기능은 어떤 것인지 좀 더 다양한 데이터가 필요하며 이에 본 연구에서는 RPNI가 만들어내는 전기생리학적 신호에 좀 더 초점을 맞추고자 하였다. RPNI가 단순 신경절단 모델과는 어떤 차이가 있는지, RPNI에서 형성되는 전기신호의 크기와 전도 속도는 어떠한지, 재신경화에는 어떤 역할을 하는지 확인하여 전기생리학적 신호의 데이터베이스를 구축하여 바이오닉 림 개발과 관련한 추가 연구에 이바지 하고자 한다.

II. 재료 및 방법

실험군별 수술과정

총 24마리의 Lewis 랫드 (8주령)을 4군으로 나누었다. (Table 1)

1 군 : 대조군 - 좌골신경 박리외에 다른 술기를 시행하지 않은 군

2 군 : 단순 신경 절단 모델 - 총비골신경 절단만을 시행한 군

3 군 : 신경 인터페이스 모델 - 총비골신경 절단 후 대퇴이두근(biceps femoris) 일부를 이용해 재생 말초 신경 인터페이스(RPNI)를 한 개 만든 군

4 군 : 신경 인터페이스 모델 - 총비골신경 절단 후 대퇴이두근(biceps femoris) 일부를 이용해 재생 말초 신경 인터페이스(RPNI)를 두 개 만든 군

사육환경

실험 기간 동안 동일한 군에 속한 랫드 2마리가 한 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 호흡마취를 시행하였으며, 호흡 마취는 isoflurane 을 3% 농도로 유지하였다. 수술은 랫드가 진정되어 심장 박동수가 안정화된 후 진행하였다.

1. 랫드의 신경 인터페이스 모델 생성

랫드가 호흡마취를 통해 충분히 안정된 이후 우측 뒷다리 부분을 삭모하였다. 수술 부위를 클로르헥시딘 0.5% 용액을 이용하여 소독하였다. 1-4군의 랫드의 뒷다리에서 고관절부터 치골결합까지 이어지는 3cm 길이의 절개를 시행하였다. (Figure 1) 심부근막을 열고 대퇴이두근과 대둔근 사이를 박리하여 그 사이에서 좌골신경을 박리하였다. 이후 좌골신경 말단에서 경골신경, 비골신경, 비복신경이 분지되는 부위까지 박리를 시행한 후 각 군별 수술을 진행하였다.

1-1. 1군의 랫드는 총비골신경을 확인한 후 추가적인 처치를 하지 않았다. (Figure 2)

1-2. 2군의 랫드는 신경이 분지되는 부분에서 원위부 1cm 지점에서 총비골신경을 절단하였다. (Figure 3)

1-3. 3군의 랫드는 신경 분지 기준으로 원위부 1cm 지점에서 총비골신경을 절단한 후 대퇴이두근을 0.3x0.4cm 만큼 박리하여 만든 근육 절편을 총비골신경 말단에 Ethilon (Nylon; Ethicon, Somerville, NJ, USA) 9-0를 이용해 봉합하여 재생 말초신경 인터페이스를 한 개 형성하였다. (Figure 4)

1-4. 4군의 랫드는 신경 분지 기준으로 원위부 1cm 지점에서 총비골신경을 절단한 후 대퇴이두근을 0.3x0.4cm, 0.2x0.2cm 만큼 박리하여 근육 절편 두개를 만든다. 총비골신경의 신경섬유를 두뭉음으로 분리하여 각각의 끝에 근육절편을 Ethilon (Nylon; Ethicon, Somerville, NJ, USA) 9-0를 이용해 봉합하여 재생 말초신경 인터페이스를 두 개 형성하였다. (Figure 5)

2. 전기생리학적 검사

신경 인터페이스 모델 생성 후 각 군의 랫드에 TECA Synergy (Viasys healthcare, UK) 를 이용하여 근전도검사와 신경전도검사를 시행하였다. 각 수술 및 검사를 마친 랫드의 수술 부위를 Vicryl Rapide (polyglactin 910; Ethicon, Somerville, NJ, USA) 4-0 봉합사를 이용해 근막, 피하층, 피부 조직 층을 맞추어 단속봉합하였다.

2-1 신경전도검사 (NCS, Nerve Conduction Study)

신경전도검사는 수술 직후, 수술 후 4주일이 되는 시점에 두 번 시행하였다. 신경전도의 Ground 전극은 랫드의 꼬리에, Reference 전극은 발목 아킬레스건 부착 부위에, Active 전극은 쥐의 앞다리 근육 (앞정강근, 긴발가락뿔근)에 꽂아 전기신호 전도를 확인하였다. (Figure 6) 3군과 4군에서는 추가적으로 형성된 RPNI 모델에서 Active 전극을 측정하였다. (Figure 7) 전기신호 자극은 좌골신경에서 0.1ms동안 10mA, 1Hz의 강도로 시행하였고 신경 피로도를 고려하여 한 마리의 랫드에 동일하게 5회 자극을 가해 진폭(Amplitude, mV)과 잠복기(latency, ms) 및 그래프를 기록하였다.

2-2 근전도검사 (EMG, Electromyography)

근전도검사는 수술 후 2주일이 되는 시점, 수술 후 4주일이 되는 시점에 두 번 시행하였다. 근전도의 Ground 전극은 랫드의 꼬리에, Reference 전극은 발목 아킬레스건 부착 부위에, Active 전극은 바늘 근전도 전극을 사용했으며 쥐의 앞다리 근육 (앞정강근, 긴발가락뿔근)에 꽂아 안정전극근전도(Resting needle EMG)를 측정하였다. (Figure 8) 기록되는 근전도 검사지에서 5초 동안 비정상 자발 전위(Abnormal Spontaneous Activity, ASA)가 관찰되는 횟수를 탈신경 정후로 간주하고 기록하였다. (Figure 9)

3. 병리조직 채취

수술 후 4주일이 되는 시점에 기존 수술부위에서 전기생리학적 검사를 완료하고 형성된 RPNI에서 병리조직을 채취하여 조직 검사 및 검경을 시행하였다. 병리조직은 Haematoxylin & Eosin (H&E) 염색을 시행하여 결과를 분석하였다. 병리조직 채취 과정에서 형성된 RPNI를 손상시키지 않기 위해 과도한 박리는 지양했으며, 채취 후 수술 부위는 Vicryl Rapide (polyglactin 910; Ethicon, Somerville, NJ, USA) 4-0 봉합사를 이용해 근막, 피하층, 피부 조직 층을 맞추어 단속봉합하였다. 병리 채취가 끝난 랫드는 마취가 깨어나기 전에 이산화탄소를 이용하여 안락사 시행하였다.

4. 통계 분석

신경인터페이스 모델에 시행한 신경전도검사에서 획득한 진폭과 잠복기의 각 군별, 시기별 차이를 비교하기 위해 대응표본 t검정(paired t-test)을 사용하였다. 추가적으로

다그룹간에 측정된 수치들의 평균비교를 위해서 독립 K 표본(Kruskal-Wallis test) 통계법을 이용하였다. 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 결과의 비교 (Figure 10)

각 군별 수술 직후 신경전도검사의 잠복기 평균은 1군이 1.55 ± 0.07 ms, 2군이 3.62 ± 1.54 ms, 3군이 2.24 ± 1.06 ms, 4군이 2.18 ± 1.29 ms 이었다. 신경 신호 진폭의 평균은 1군이 14.12 ± 5.30 mV, 2군이 2.76 ± 2.78 mV, 3군이 4.21 ± 2.33 mV, 4군이 5.78 ± 3.13 mV 이었다.

수술 시행 4주 후 재시행한 신경전도검사의 잠복기 평균은 1군이 1.59 ± 0.25 ms, 2군이 3.04 ± 0.26 ms, 3군이 2.96 ± 0.68 ms, 4군이 2.93 ± 0.24 ms 이었다. 신경 신호 진폭의 평균은 1군이 17.32 ± 8.87 mV, 2군이 4.64 ± 1.41 mV, 3군이 8.23 ± 2.99 mV, 4군이 8.13 ± 2.31 mV 이었다. (Table 2)

각 군의 평균값에 대응표본 t검정을 시행하여 수술 직후와 수술 후 4주를 비교하였을 때, 신경전도검사 수치에 유의한 차이가 있는 군은 RPNI를 한 개 시행한 3군의 latency ($p=0.046$)와 amplitude ($p=0.029$), RPNI를 두 개 시행한 4군의 amplitude ($p=0.005$)였다.

2. 신경전도검사 결과 잠복기와 진폭 변화의 통계적인 비교

각 군의 latency와 amplitude의 평균값을 구해 대응표본 t검정으로 수술 4주 후의 평균 수치를 비교하였다. Latency의 경우, 대조군인 1군과 총비골신경 단순 절단 모델인 2군 간에 통계적으로 유의한 차이가 관찰되었다 ($p=0.000$). 1군과 RPNI를 한 개 시행한 3군의 차이 ($p=0.000$), RPNI를 두 개 시행한 4군의 차이 ($p=0.000$) 간에도 통계적 유의성이 발견되었다. 2, 3, 4군 사이에서는 서로간의 유의한 차이가 관찰되지 않았다. (Figure 11)

Amplitude의 경우, 대조군인 1군과 2군 ($p=0.012$), 3군 ($p=0.002$), 4군 ($p=0.023$) 각각이 수치상에서 유의한 차이를 보였다. 총비골신경 단순 절단 모델인 2군과 RPNI를 한 개 시행한 3군간에 유의한 차이값이 나타났다 ($p=0.007$). 마찬가지로 RPNI를 두개 시행한 4군과도 유의한 차이를 보였다 ($p=0.010$). 다만 RPNI를 1개 시행한 3군과 2개

시행한 4군에서는 통계적으로 유의한 차이가 관찰되지 않았다 ($p=0.764$). (Table 3)
(Figure 12) (Figure 13)

3. 근전도 검사 결과

수술 시행 2주 후 시행한 근전도검사에서 5초 당 비정상 자발전위의 발생횟수 평균은 2군이 3.25 ± 1.49 회, 3군이 3.75 ± 2.12 회, 4군이 3.50 ± 2.39 회 이었다. ($p=0.842$)
수술 시행 4주 후 시행한 근전도검사에서 5초 당 비정상 자발전위의 발생횟수 평균은 2군이 9.38 ± 4.44 회, 3군이 4.75 ± 2.25 회, 4군이 3.50 ± 1.60 회 이었다. ($p=0.138$) 각 군의 평균비교는 Kruskal-Wallis 검정을 시행했으며 통계적 유의성이 확인되었다. (Table 4) (Figure 14) (Figure 15)

4. 병리 검사 결과

수술 시행 후 4주일 째 생성된 RPNI 검체를 채취해 파라핀 블록 및 절편을 만들었다. 이 후 절편에 Haematoxylin & Eosin (H&E) 염색을 시행하여 결과를 분석한 결과 신경세포와 골격근 세포의 혼재화(co-localization)가 관찰되었으며 신경세포 쪽으로 신생혈관증식 소견이 관찰되었다. (Figure 16)

IV. 고찰

재생 말초신경 인터페이스(RPNI) 수술은 사지의 주절단시 생기는 신경 말단에 신체 근육 일부를 떼어내어 감싸줌으로써 신경의 재연결 및 재신경화를 유도하는 수술로, 흔히 절단 후 발생하는 환상통 및 신경종 발생을 탁월히 줄이는 효과는 이미 기존 임상시험을 통해 입증되었다.[4, 5] 이와 같은 생체신호를 활용하여 로봇사지를 구동하려는 시도가 꾸준히 있어왔고 그 신경 신호 전달 및 최적화를 위해 노력하고 있다. [1] RPNI는 절단된 신경을 통해서 원래 전달되어야 할 신호가 말단에 삽입된 근육을 통해 전달되고 수축이 된다는 것을 증명해냈으며, [2, 8] 이는 말초신경신호가 생체학적으로 증폭이 되어 근전도신호로 변환된다는 것을 의미한다.[9, 10] 즉, 말초신경분지 끝단에서 전달되는 근전도신호를 받아들여 저장할 수 있다면 생체형 로봇 적용에도 큰 도움이 될 것이다.

본 실험을 통해 RPNI는 수술 후 4주째 충분한 진폭을 가진 복합근육활동전위를 만들어낼 수 있어 그 가능성이 증명되었다. 이번에는 바늘 신경전도/근전도 전극을 이용해 전기신호를 측정하였는데 이는 기존의 이식형 전극을 삽입하여 전기신호를 얻어낸 실험 결과 [2]와는 들어가는 전기신호를 조절할 수 있다는 점에서 차이가 있다. 다만 추후 착용형 로봇에 활용하고자 하는 신경인터페이스의 특징 상 부착형 전극을 이용해 피부 표면에 흐르는 전기신호를 잡아내는 과정이 필요하며 해당 부분에 대해서는 추가 연구가 필요하다.

수술 직후와 수술 후 4주 후 측정된 값을 비교하였을 때 RPNI를 시행한 3군과 4군에서 전기신호의 진폭에 유의한 차이가 있음을 알 수 있었고 이는 또한 RPNI가 수술 부위에 생착되었음을 알려주는 지표이다. 다만 수술 직후 측정된 전기신호들은 수술을 시행한 신경이 아니라 주변 근육을 타고 돌아 들어가 Active 전극에 다다른 지연성

전도(Delayed transmission)의 가능성이 있어 수술 전후의 차이로 완벽하게 신뢰하기는 어렵다. 같은 이유로 수술 후 4주에 측정한 신경전도검사 결과에는 군별 분석을 시행한 반면, 수술 직후 측정한 신경전도검사 결과는 실제로 표준편차가 상당히 크게 나타나 진행하지 않았다.

수술 4주 후 시행한 신경전도검사 결과는 특기 할만 한데, 잠복기의 경우 모든 실험군에서 대조군인 1군과 비교해 잠복기는 길어지고 진폭은 작아진 양상을 보여주었으며 통계적으로 유의한 차이가 있었다. 이는 말초신경에 조작을 가한 군들에서 신경 손상 후 그 신호전달이 느려지고 자극 전달의 크기가 작아지는 변화가 나타난다는 것을 보여준다. 이와 같은 결과에는 대조군으로 사용한 1군의 신경전도검사 결과 그래프가 비교적 일정하게 나온 것이 큰 역할을 했으며 이 대조군의 안정성이 연구 전체의 신뢰도를 높여준다.

총비골신경을 단순히 절단한 군인 2군과 RPNI를 시행한 3군, 4군 간의 비교에서 후자의 진폭이 더 크게 나온 것 또한 괄목할 결과이다. 진폭은 근전도검사에서 보통 기능을 하는 Axon의 개수와 연관이 있다고 생각되는 수치인데 [11] RPNI군의 진폭이 더 높게 나온 것은 단순 절단 모델보다 더 많은 Axon이 말단에서 살아남은 것으로 볼 수 있으며, 이를 통해 재신경화가 진행되고 신호 증폭에 기여하는 것으로 생각된다. 그에 비해 절단 모델과 RPNI 시행군 간에 잠복기 평균의 차이는 통계적으로 유의하지 않았다.

RPNI 개수에 따라 신호가 증폭되는 정도가 다를 것이라고 생각해 개수에 따른 군별 비교도 진행했는데 3군과 4군의 신경전도검사에서는 유의한 차이가 발견되지 않았다. 수술 후 대기한 시간이 짧아 충분한 재신경화를 이루지 못한 것이 가장 큰 원인으로 생각된다. 또한 수술 진행과정에서의 기술적 에러의 가능성도 있는데, 실제로 4주 후 수술 부위를 재절개했을 때 주변부의 섬유화가 매우 심했으며 대둔근과 대퇴이두근 사이의 박리가 첫 절개보다 까다로웠다. RPNI를 두개 만들게 되면 수술 시간이

길어지고 주변 조직에 대한 조작이 더 많아져 수술 후 낮는 과정에서 더 많은 섬유화를 유발하게 되고 이런 변화가 전기생리학적 검사에 반영되었을 가능성이 있다.

근전도 검사 결과에서 비정상 자발전위의 수치를 본 것은 탈신경화의 정도를 군별로 비교하기 위해서였다. 실제로 5초 단위로 분석한 비정상 자발전위의 횟수는 수술 후 2주일이 경과한 시점에는 거의 차이가 나지 않았지만 4주일째 시행한 근전도에서는 단순 절단 모델에서 RPNI군에 비해 훨씬 많이 나타났다. 이는 RPNI를 시행하면 단순히 신경 전달만 시행할 경우보다 탈신경화가 덜 일어난다고 해석할 수 있겠으나, 3개의 군에 대해 시행한 다변수 검정에서는 통계적 유의성은 증명되지 않았다. 좀 더 장기간의 추가 실험 후 유의한 변화를 확인할 수 있을 것이라 기대한다.

수술 4주 후 수술 부위를 재절개하고 육안으로 RPNI를 확인했을 때 전반적으로 붉은 색을 띄고 주변에서 혈류 공급을 받고 있는 것으로 보아 수술부위에 생존하여 있는 것으로 생각되었다. 해당 부위에서 채취한 검체를 통해 진행한 병리조직 검정에서 신경조직 부근에 자라들어간 모세혈관이 보여 혈관연결 소견을 발견할 수 있었으며 일부 섬유모세포와 결합조직이 근육쪽으로 침투한 모습을 보여주었다. 근육세포와 신경세포가 혼재하는 양상 또한 관찰할 수 있었으나 신경근접합부는 관찰할 수 없었다. 신경근접합 조직은 비교적 취약하여 쉽게 부서지는데 파라핀 블록을 절편으로 만드는 과정에서 손실되었을 가능성이 높다. 기타 염색에서는 특기할만한 소견이 관찰되지 않았다.

본 연구에는 몇가지 한계점이 존재한다. 첫째, 선행연구들에서 수술 후 4주차에 RPNI에 재신경화가 일어난다는 것을 발견하여[1] 수술 후 4주차에 결과를 도출하였는데 좀 더 장기간의 결과가 없다는 점은 다소 아쉽다. 이후 후속 연구를 통해 수술 후 시간이 경과함에 따라 신경전도 및 근전도 검사 결과가 어떻게 변화하는지 추가 정보를 얻을 필요가 있다. 둘째, 수술 직후 측정된 신경전도검사의 결과는 위양성일 가능성이 있다. 수술 직후 RPNI에 아직 재신경화가 이루어지지 않은 상태에서 좌골신경에 전기신호를 가하여 그 결과 그래프를 얻었기 때문에 주변 근육이나 기타 신경을 타고 들어온 지연성

전도(Delayed transmission)일 가능성을 배제하기 어렵다. 따라서 본 연구에서는 수술 직후 신경전도검사에 대한 군별 분석을 시행하지 않았으며 수술 직후 검사 수치와 수술 4주 후 검사수치의 비교에 큰 의미를 두지 않았다. 셋째, 3군과 4군간의 비교에서 유의한 차이를 얻지 못했으며 병리조직 검경 결과도 특기할 만한 결과를 얻지 못했다. 추후 실험군의 숫자를 늘려 좀 더 장기간의 연구를 진행할 필요가 있다. 넷째, 본 실험은 어디까지나 전임상연구로 진행한 것으로 실제로 임상적으로 적용했을 때 인체에서 어떤 식의 반응을 보일 것인지는 후속 연구가 필요하다.

V. 결론

본 연구는 신경 말단에서 근육 이식절편을 이용해 만든 재생 말초신경 인터페이스(Regenerative Peripheral Nerve Interface)의 효용성을 동물실험을 통해 입증한 몇 안되는 전임상연구로 현재 활발하게 진행되고 있는 신경 인터페이스 후속 연구들의 선행연구로 역할을 할 수 있을 것으로 기대한다. 재생 말초신경 인터페이스는 신경 말단의 재신경화를 유도하고 전기신호를 증폭할 수 있다는 점에서 추후 바이오닉 림과 절단 사지의 연결에 유용한 도구로 사용될 수 있다. 다만 선행 임상연구가 거의 없는 상황에서 실제 임상에서 동일한 효과를 나타낼 수 있을지는 추가 연구가 필요한 부분이다.

VI. 참고문헌

1. 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.
2. Kung, T.A., et al., *Regenerative peripheral nerve interface viability and signal transduction with an implanted electrode*. Plast Reconstr Surg, 2014. **133**(6): p. 1380-94.
3. Ursu, D.C., et al., *In vivo characterization of regenerative peripheral nerve interface function*. J Neural Eng, 2016. **13**(2): p. 026012.
4. Kubiak, C.A., et al., *Prophylactic Regenerative Peripheral Nerve Interfaces to Prevent Postamputation Pain*. Plast Reconstr Surg, 2019. **144**(3): p. 421e-430e.
5. Santosa, K.B., et al., *Regenerative Peripheral Nerve Interfaces for Prevention and Management of Neuromas*. Clin Plast Surg, 2020. **47**(2): p. 311-321.
6. Frost, C.M., et al., *Regenerative peripheral nerve interfaces for real-time, proportional control of a Neuroprosthetic hand*. J Neuroeng Rehabil, 2018. **15**(1): p. 108.
7. Vu, P.P., et al., *A regenerative peripheral nerve interface allows real-time control of an artificial hand in upper limb amputees*. Sci Transl Med, 2020. **12**(533).
8. Sando, I.C., et al., *Regenerative Peripheral Nerve Interface for Prosthesis Control: Electrode Comparison*. J Reconstr Microsurg, 2016. **32**(3): p. 194-9.
9. Dellon, A.L. and O.C. Aszmann, *In musculus, veritas? Nerve "in muscle" versus targeted muscle reinnervation versus regenerative peripheral nerve interface: Historical review*. Microsurgery, 2020. **40**(4): p. 516-522.
10. Valerio, I., et al., *Targeted Muscle Reinnervation Combined with a Vascularized Pedicled Regenerative Peripheral Nerve Interface*. Plastic and reconstructive surgery. Global open, 2020. **8**(3): p. e2689-e2689.
11. 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.

Table (표)

Table 1. 군별 시행된 실험 과정

Group	Open & Close	CPN amputation	RPNI (1 st)	Division RPNI (2 nd)
1 군 (n=6)	○	X	X	X
2 군 (n=6)	○	○	X	X
3 군 (n=6)	○	○	○	X
4 군 (n=6)	○	○	○	○

CPN; common peroneal nerve, RPNI; regenerative peripheral nerve interface

Table 2. 신경전도검사 결과

	수술 직후 측정 결과				수술 4주 후 측정 결과					
	Latency (ms)		Amplitude (mV)		Latency (ms)			Amplitude (mV)		
	Average	SD	Average	SD	Average	SD	p-value	Average	SD	p-value
1군	1.55 (1.52-1.79)	0.073	14.12 (3.89-25.57)	5.303	1.59 (1.52-2.46)	0.250	0.583	17.32 (4.59-30.37)	8.865	0.697
2군	3.62 (1.52-5.79)	1.543	2.76 (0.06-8.56)	2.795	3.04 (2.69-3.31)	0.264	0.203	4.64 (2.69-6.81)	1.412	0.423
3군	2.24 (1.52-4.56)	1.056	4.21 (0.14-7.77)	2.334	2.96 (1.52-3.69)	0.678	0.046	8.23 (3.13-10.29)	2.989	0.029
4군	2.18 (1.52-5.17)	1.290	5.78 (0.61-10.27)	3.133	2.93 (2.63-3.27)	0.243	0.316	8.13 (5.83-12.49)	2.307	0.005

Table 3. 신경전도검사 결과 잠복기와 진폭 변화의 통계학적 비교

1) 수술 후 4주차 잠복기(Latency)의 변화 (대응 군간의 p-value)

p-value	1군	2군	3군	4군
1군		0.000	0.000	0.000
2군	0.000		0.873	0.078
3군	0.000	0.873		0.287
4군	0.000	0.078	0.287	

2) 수술 후 4주차 진폭(Amplitude)의 변화 (대응 군간의 p-value)

p-value	1군	2군	3군	4군
1군		0.012	0.002	0.023
2군	0.012		0.007	0.010
3군	0.002	0.007		0.764
4군	0.023	0.010	0.764	

Table 4. 근전도 검사 결과 - 비정상 자발전위의 횟수

	2 군 (n=6) 평균±표준편차	3 군 (n=6) 평균±표준편차	4 군 (n=6) 평균±표준편차	p-value ¹⁾
2 주 후	3.25±1.49	3.75±2.12	3.50±2.39	0.842
4 주 후	9.38±4.44	4.75±2.25	3.50±1.60	0.138

1) Statistical significance test was done by Kruskal-wallis

그래프 및 그림

Figure1. 신경 인터페이스 모델 형성 수술 디자인 - 쥐의 뒷다리에 고관절부터 치골결합까지 이어지는 3cm 절개를 시행한다

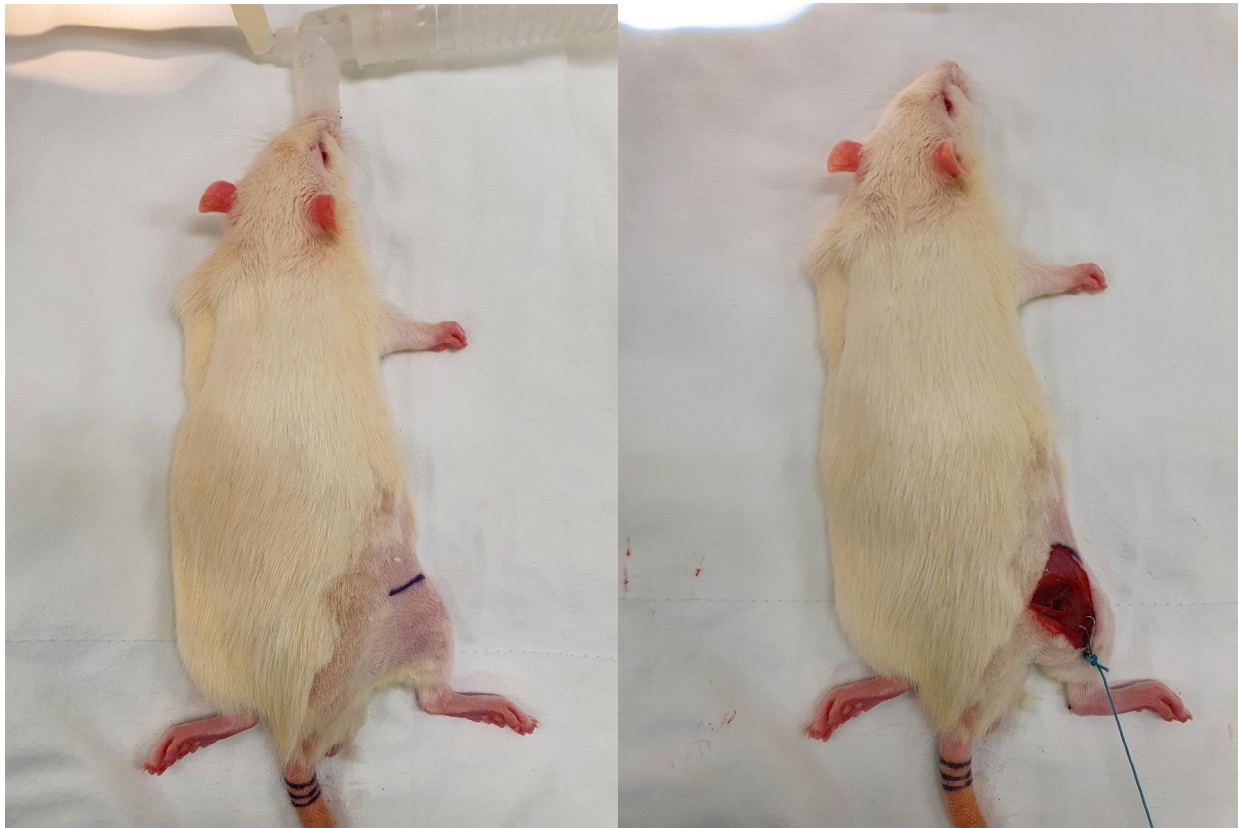


Figure 2. 좌골신경 박리 (1군)



Figure 3. 비골신경 절단 (2군)



Figure 4. 재생 말초신경 인터페이스(RPNI)를 한 개 시행한 군 (3군)

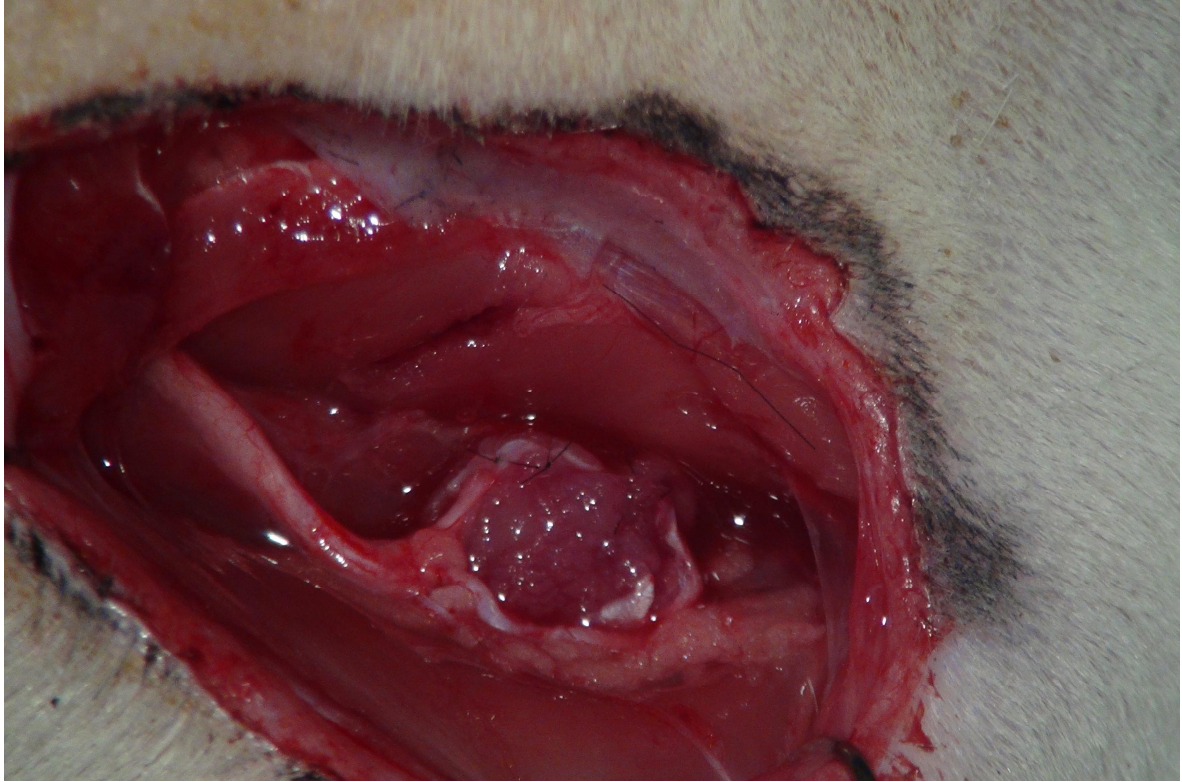


Figure 5. 재생 말초신경 인터페이스(RPNI)를 두 개 시행한 군 (4군)

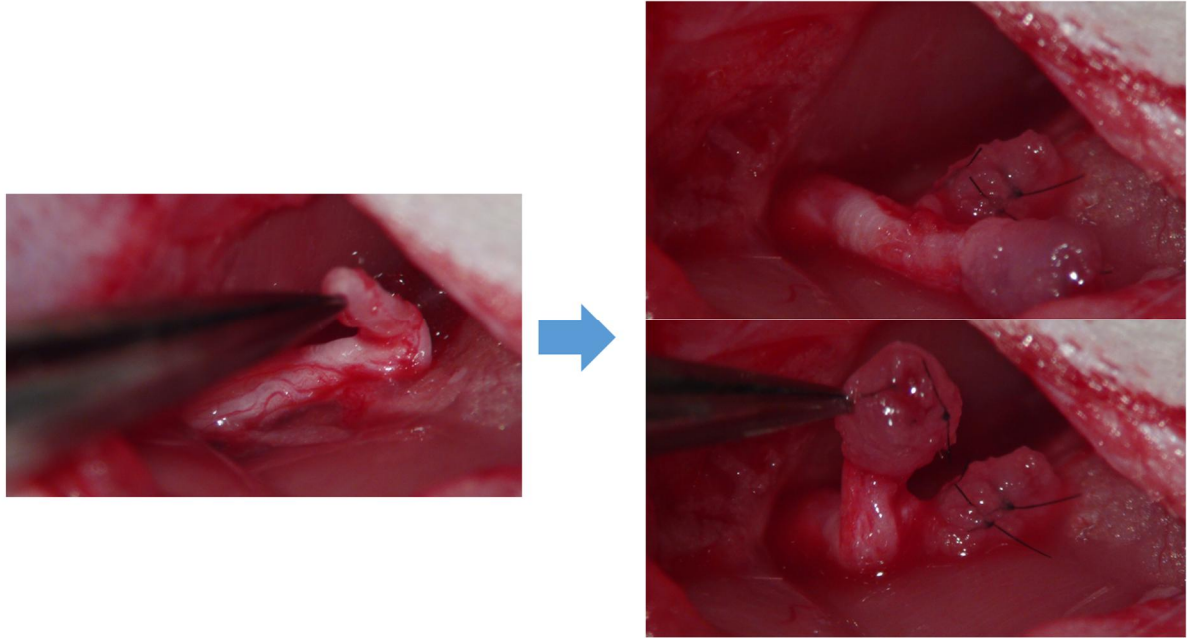


Figure 6. 신경전도검사 시행 모식도

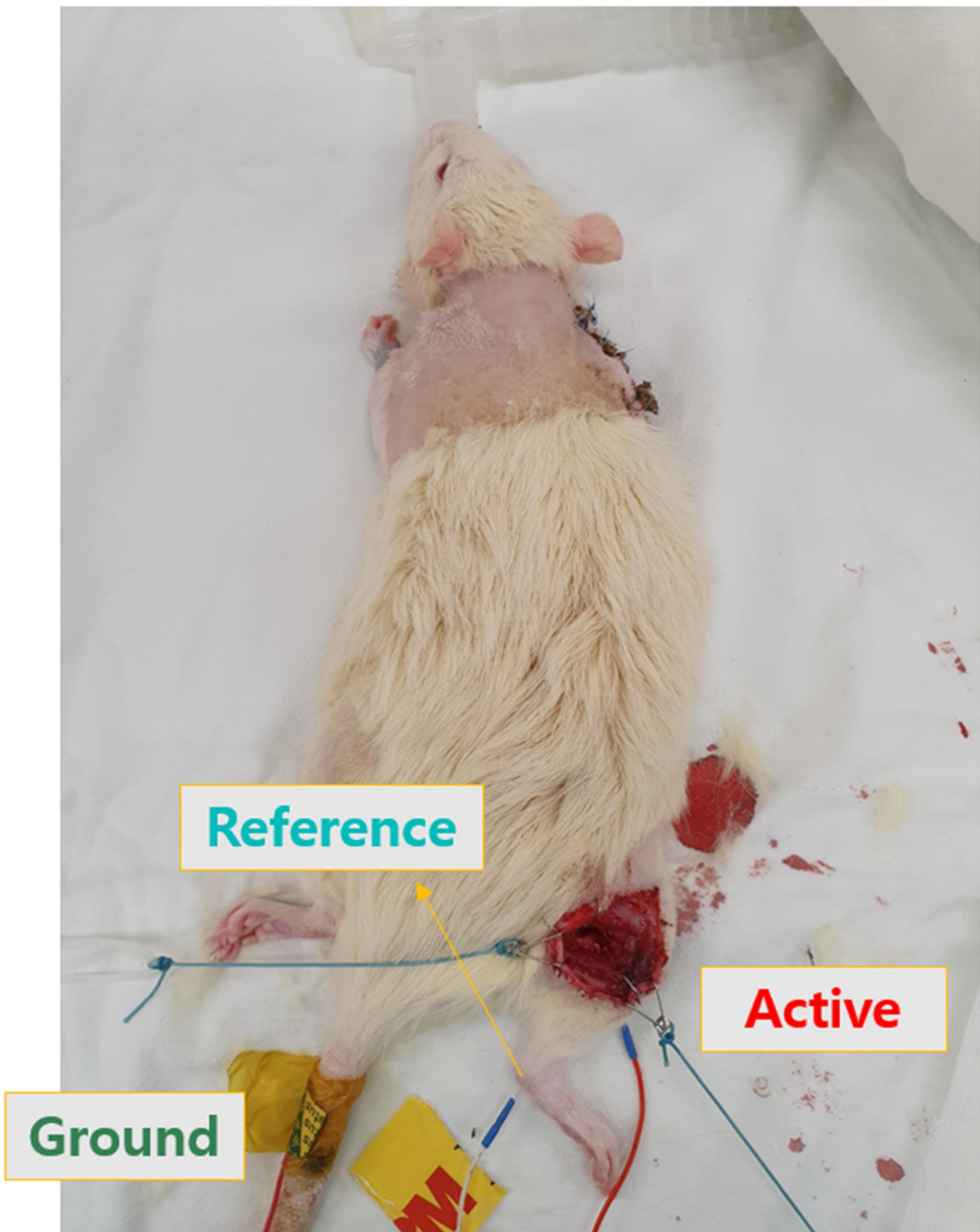


Figure 7. 각 군의 신경전도검사 Active 부착 부위

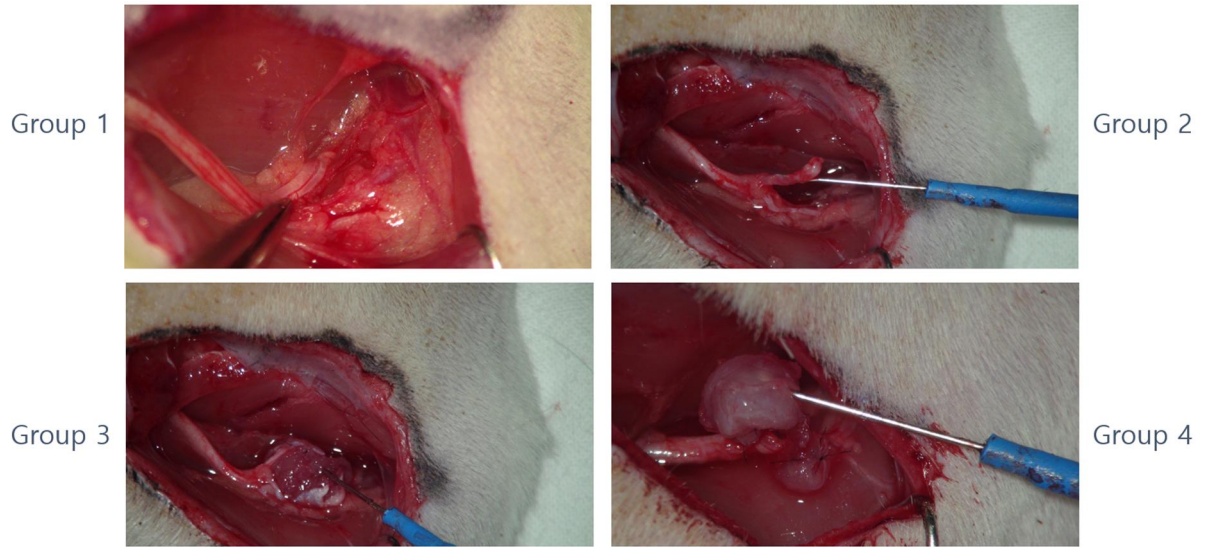


Figure 8. 근전도검사 시행 모식도

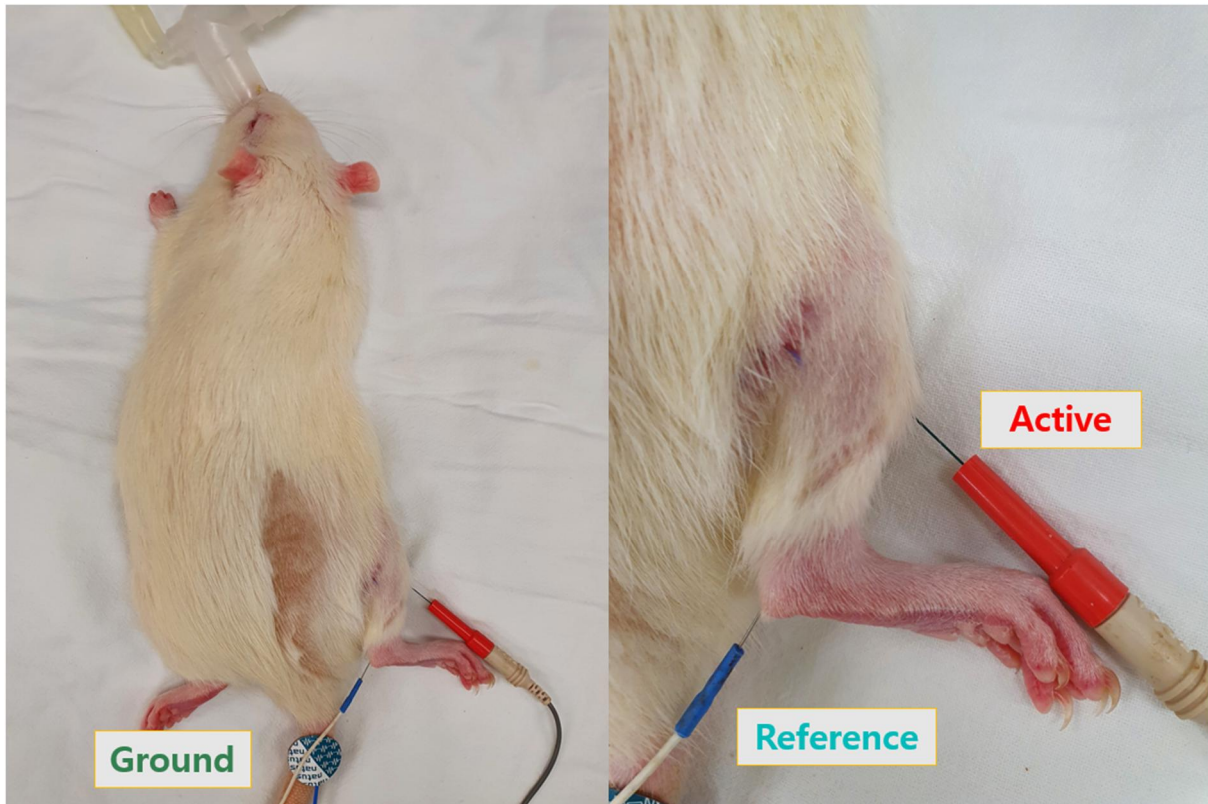


Figure 9. 근전도검사에서 도출되는 비정상 자발전위 (붉은 화살표)



Figure 10. 신경전도검사 결과 각 군별 비교 그래프 - 수술 직후 시행한 신경전도검사의 결과값과 수술 시행 4주후 결과값의 비교 (CPN; common peroneal nerve, RPNI; regenerative peripheral nerve interface)

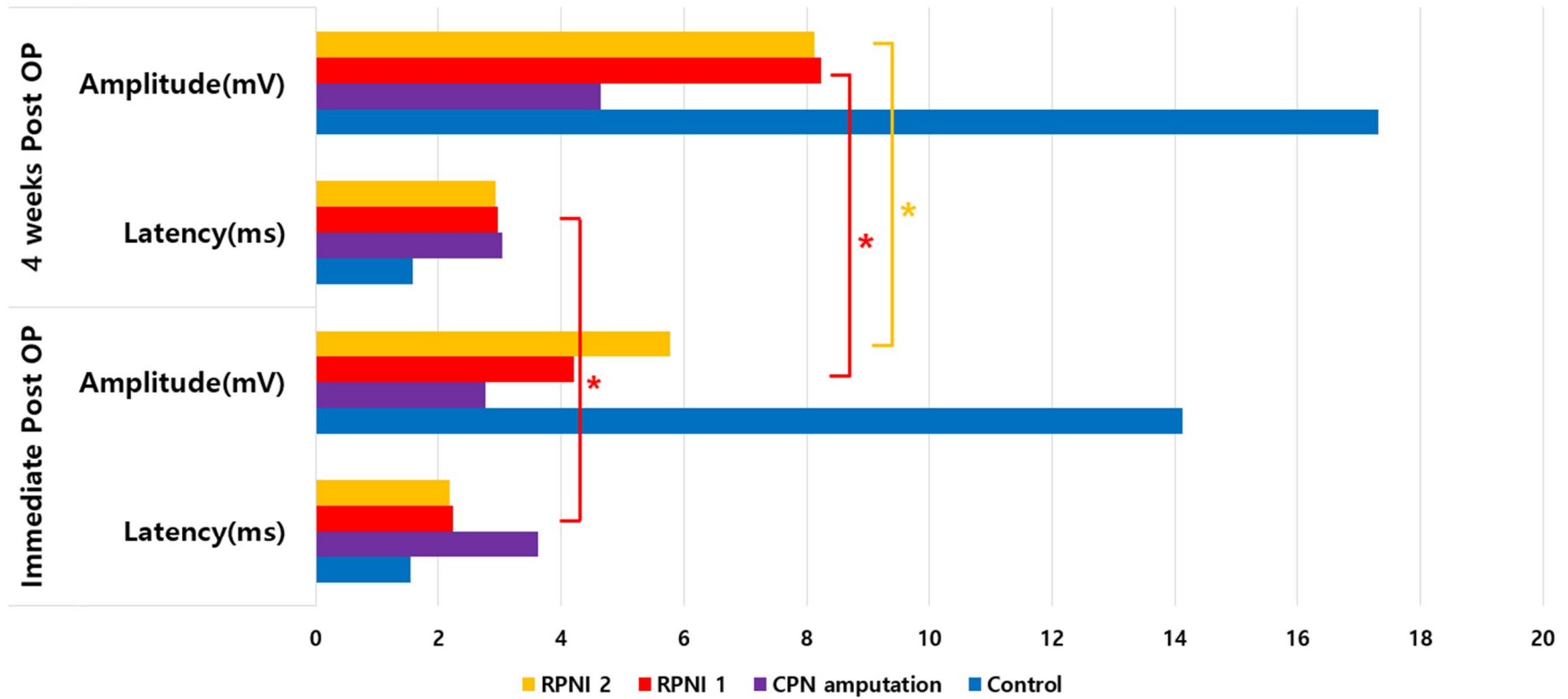


Figure 11. 신경전도검사 - 각 군별 잠복기 비교 그래프 (CPN; common peroneal nerve, RPNI; regenerative peripheral nerve interface)

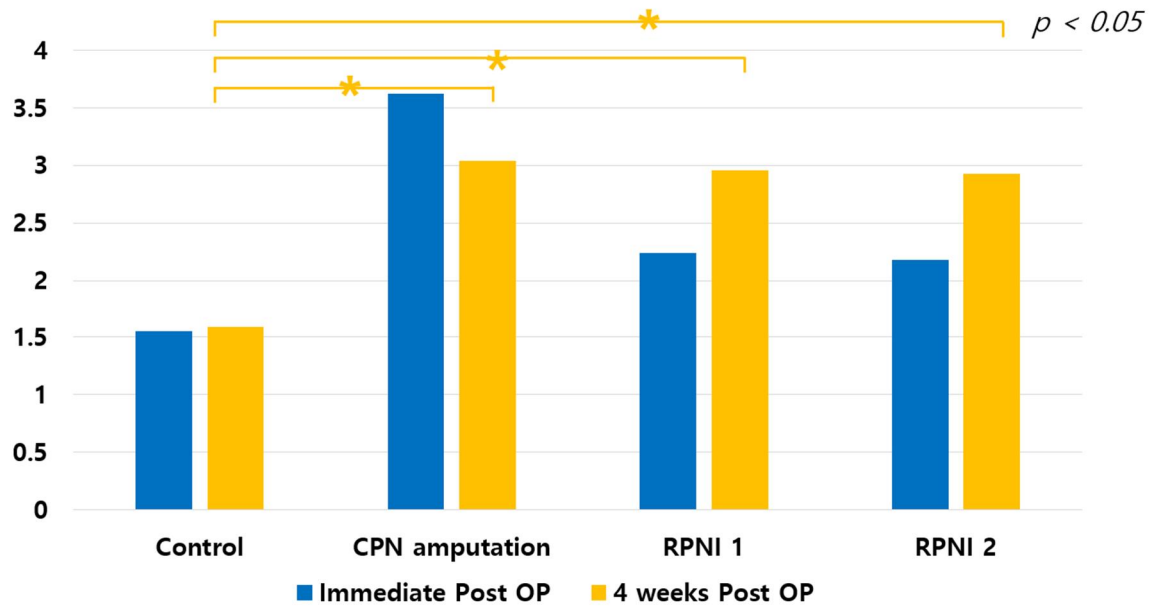


Figure 12. 신경전도검사 - 각 군별 진폭 비교 그래프 (CPN; common peroneal nerve, RPNI; regenerative peripheral nerve interface)

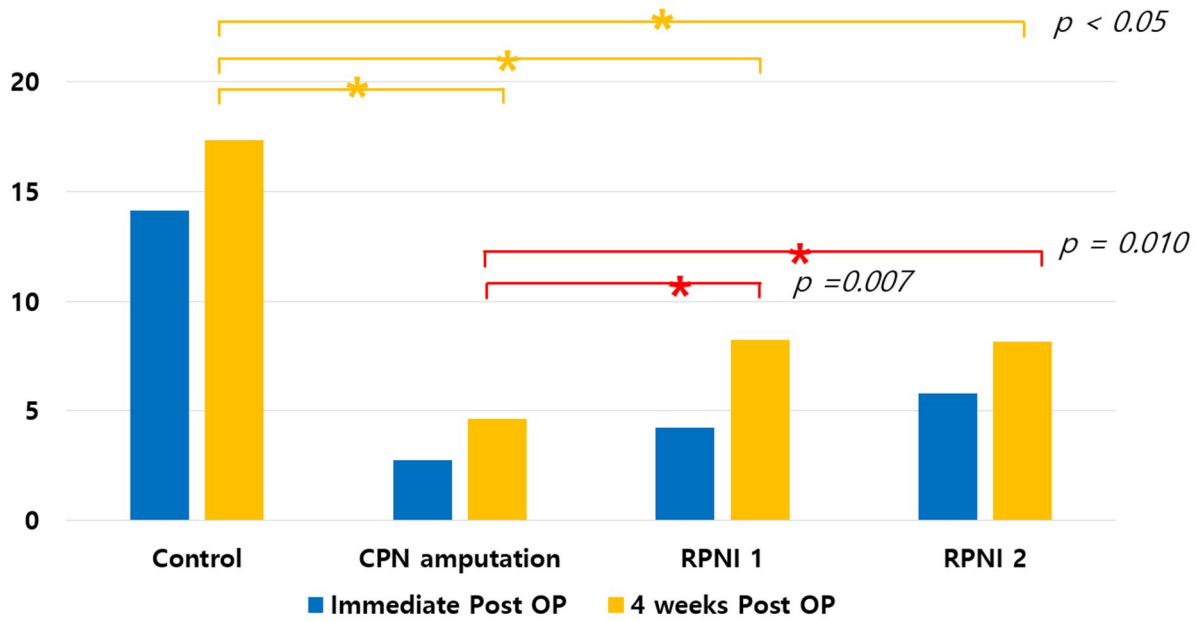


Figure 13. 신경전도검사 군별 대표 예제 - (상) 수술 4주 후 측정된 1군의 신경전도 그래프 (중) 수술 4주 후 측정된 2군의 신경전도 그래프 (하) 수술 4주 후 측정된 3군의 신경전도 그래프

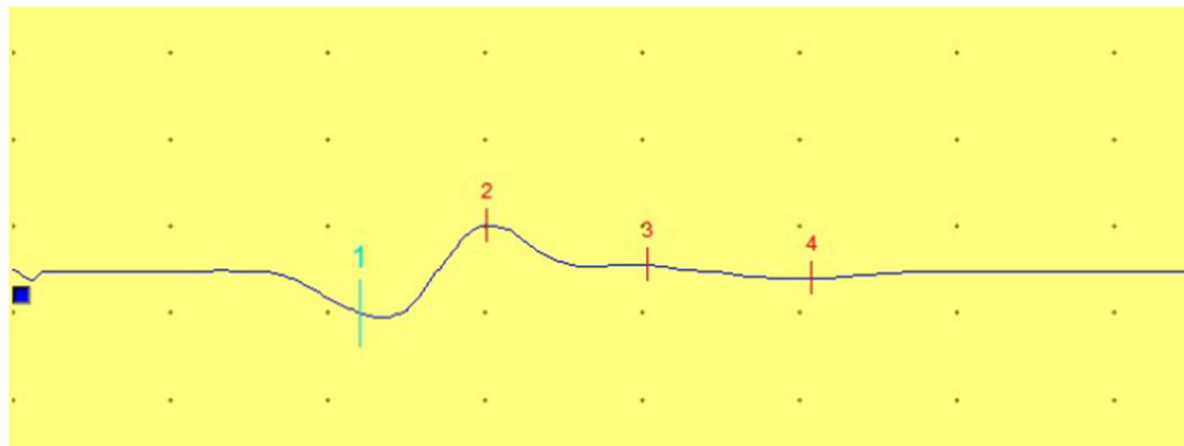
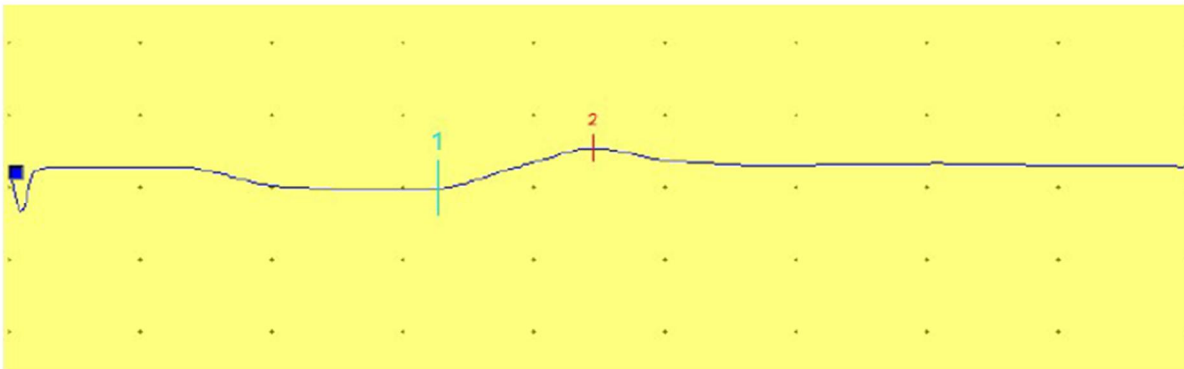
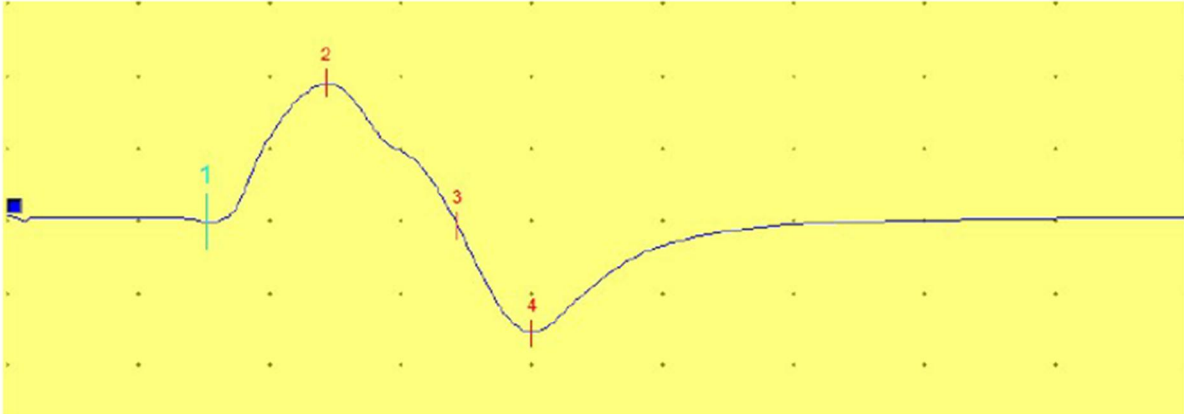


Figure 14. 근전도검사 결과 군별 비교 그래프 (CPN; common peroneal nerve, RPNI; regenerative peripheral nerve interface)

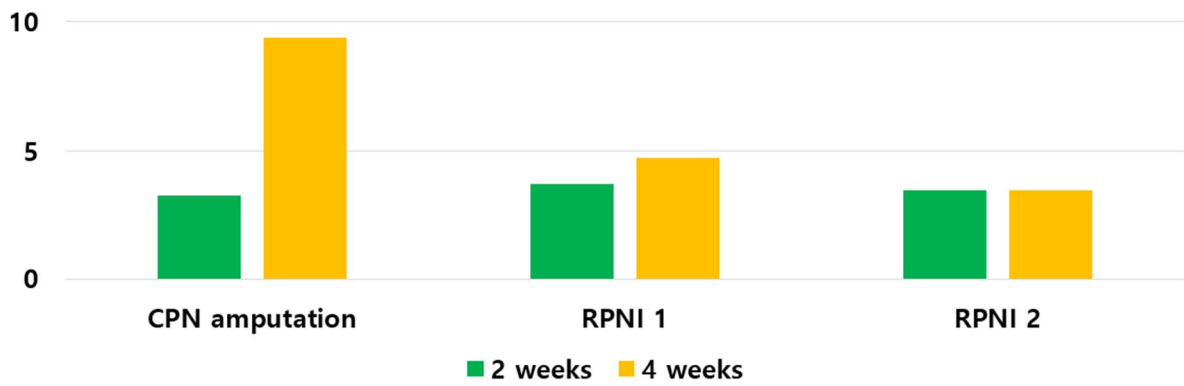


Figure 15. 근전도검사 군별 대표 예제 (상) 수술 4주 후 1군의 근전도 그래프 (중) 수술 4주 후 2군의 근전도 그래프 (하) 수술 4주 후 3군의 근전도 그래프

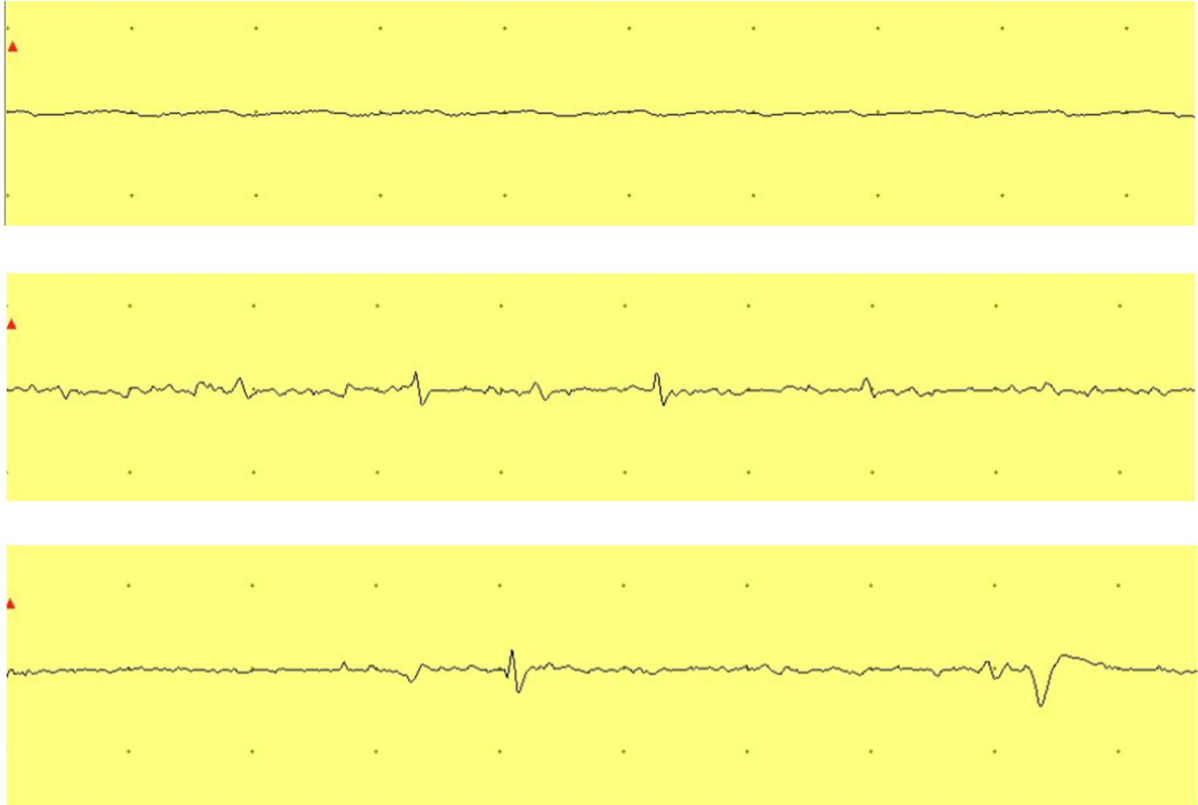
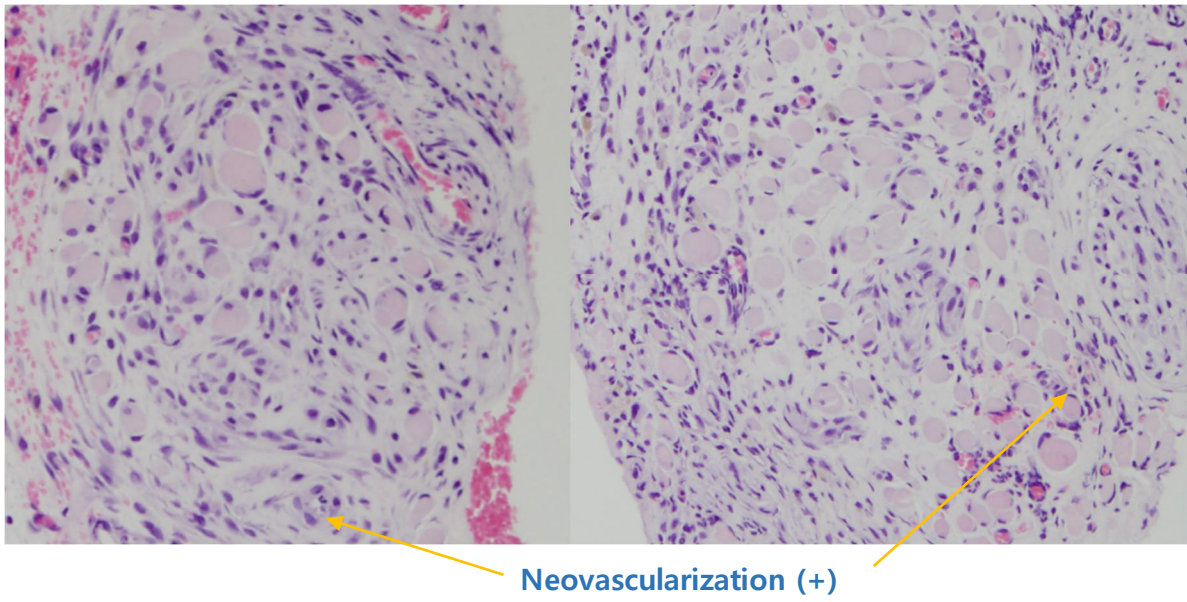


Figure 16. 병리조직 결과 - H&E (좌) 골격근세포와 신경세포의 혼재화 (우)
신생혈관 생성



영문 요약

Introduction

As the morbidity of extremities amputation increases, social costs of treatment and rehabilitation are rapidly increasing. The existing prosthesis has developed a lot so far, but it shows various limitations in actual use. The amputated patients not only from functional loss but also from painful neuroma for a long time ago. As a fundamental solution, various research on robot bionic limbs is actively underway. Natural electric signal control to spinal cord, peripheral nerve, and muscle is essential for bionic limbs to implement sophisticated human movements. Wearing type prosthesis is easier to use than implemented type, but it is difficult to implement a model that accepts electric signals from the nerve end on the skin surface. By several previous studies, we know that peripheral neural signals are biologically amplified at the extremities and converted into myographic signals, and expect intuitive control of the upper and lower extremities robot limbs if we can record and control them properly. For this purpose, the technology of implanting free muscle graft at the nerve end to make regenerative peripheral nerve interface (RPNI) to amplify electric signals has recently been in the spotlight. The main purpose of this study is to prove the scientific basis of RPNI through electrophysiological studies using rats. Furthermore, we would like to compare its effects with simple amputation models and provide experimental basis for the development of RPNI.

Methods

A total of 24 Lewis rats (8 weeks of age) were divided into 4 groups.

Group 1: Control group – only dissect the sciatic nerve and peroneal nerve

Group 2: Common peroneal nerve (CPN) amputation group – amputate common peroneal nerve after dissection

Group 3: RPNI 1 group – form one RPNI at the end of common peroneal nerve using part of the biceps femoris muscle

Group 4: RPNI 2 group – form two RPNIs at the two division of common peroneal nerve end using part of the biceps femoris muscle

1. Creating a RPNI model in rats

After performing an incision on a rat's hind leg, opened the deep fascia and separated biceps femoris muscle and gluteus muscles. Dissection of the sciatic nerve was done till the bifurcation point of tibial nerve, common peroneal nerve, and sural nerve was exposed. At the end of the peroneal nerve, the surgery was performed as specified in each group. Group 1 recorded the electrophysiological studies results after only dissection was implemented.

2. Primary electrophysiological studies – Nerve conduction study (NCS)

Immediately after the creating of RPNI, NCS and EMG was done to operation site by TECA Synergy (Viasys healthcare, UK). We caught the signal from anterior compartment of lower leg muscles or RPNI stimulating sciatic nerve. After examinations, simple interrupted sutures layer by layer were performed at operation site using Vicryl Rapide (polyglactin 910; Ethicon, Somerville, NJ, USA) 4-0.

3. Secondary electrophysiological studies – Electromyography (EMG)

Postoperative two weeks, a non-invasive electrophysiological study was conducted—EMG. Resting Needle EMG was done and the needle lead was inserted into the anterior compartment of lower leg muscles of the rat and obtained the number of abnormal spontaneous activity (ASA) per 5 seconds.

4. Third electrophysiological studies – NCS, EMG

Postoperative four weeks, opened the previous incision and conducted NCS again in the same manner. Resting needle EMG was conducted again. Both test results were recorded and compared with the results of the previous one.

5. Obtain the pathological specimen

After conducting final electrophysiological studies, part of the RPNI specimen was extracted and sent to pathologist for further examination. The operation site was sutured in the same way as the first operation.

6. Statistical analysis

For comparison between groups, the paired t-test method was used. A non-parametric test such as Kruskal-wallis test was used to compare the means between multiple groups.

Results

1. Comparison of the nerve conduction study results

In the operation day, the average latency of each groups was 1.55 ± 0.07 ms for group 1, 3.62 ± 1.54 ms for group 2, 2.24 ± 1.06 ms for group 3, and 2.18 ± 1.29 ms for group 4, respectively. The average amplitude of each groups was 14.12 ± 5.30 mV in group 1, 2.76 ± 2.78 mV in group 2, 4.21 ± 2.33 mV in group 3, and 5.78 ± 3.13 mV in group 4, respectively.

In the postoperative week 4, the average latency of each groups was 1.59 ± 0.25 ms for group 1, 3.04 ± 0.26 ms for group 2, 2.96 ± 0.68 ms for group 3, and 2.93 ± 0.24 ms for group 4, respectively. The average amplitude of each groups was 17.32 ± 8.87 mV in group 1, 4.64 ± 1.41 mV in group 2, 8.23 ± 2.99 mV in group 3, and 8.13 ± 2.31 mV in group 4, respectively.

2. Comparison of the electromyographic results

In the postoperative week 2, the mean number of ASA per 5 seconds was 3.25 ± 1.49 in group 2, 3.75 ± 2.12 in group 3, and 3.50 ± 2.39 in group 4, respectively. ($p=0.842$)

In the postoperative week 4, the mean number of ASA per 5 seconds was 9.38 ± 4.44 in group 2, 4.75 ± 2.25 in group 3, 3.50 ± 1.60 in group 4, respectively. ($p=0.138$)

3. Pathologic examination

Co-localization of skeletal muscles and nerve cells was seen at the pathologic specimen. Neovascularization toward the nerve cells was observed.

Conclusion

This study is one of the few preclinical studies demonstrate the electrophysiological effect of RPNI and validate the neural signals through an animal experiment. It is expected that this study will serve as a basis prior study of following nerve interface studies dealing with bionic limbs. However, it is necessary to further study whether the same effect can be shown in clinical trials when there are few prior clinical evidences.