



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](#)

공학박사학위논문

척수의 신경 세포 재생 및 손상 모니터링을 위한  
이식형 신경소자

**IMPLANTABLE NEURAL DEVICES FOR REGENERATIVE  
NEURAL AXON REGENERATION AND INJURY  
MONITORING OF SPINAL CORD**

2013년 2월

서울대학교 대학원  
전기·컴퓨터공학부  
정진우

척수의 신경 세포 재생 및 손상 모니터링을 위한 이식형  
신경소자

**IMPLANTABLE NEURAL DEVICES FOR REGENERATIVE  
NEURAL AXON REGENERATION AND INJURY  
MONITORING OF SPINAL CORD**

지도교수 전 국 진

이 논문을 공학박사 학위논문으로 제출함

2013년 2월

서울대학교 대학원

전기·컴퓨터공학부

정 진 우

정진우의 학위논문을 인준함

위 원 장 \_\_\_\_\_ (인)

부위원장 \_\_\_\_\_ (인)

위 원 \_\_\_\_\_ (인)

위 원 \_\_\_\_\_ (인)

위 원 \_\_\_\_\_ (인)

## 요약문

중추신경계(CNS)에 속하는 척수 신경이 손상을 받으면 감각 및 운동 기능의 영구적 손실이 발생하기 때문에, 척수의 기능 회복을 위한 많은 연구가 수행되었다. 생체적합성 스캐폴드 및 재생을 돕는 약물을 이용한 다양한 연구가 수행되었고, 동물 모델을 통해서 상당히 긍정적인 재생효과를 확인하였지만, 아직까지는 그 효과에 한계가 있다. 그 대안으로써 인공 보철 장치의 신경 인터페이스 소자의 개념이 제안되어 연구되어 왔으나, 여전히 손상된 척수로부터의 신경 신호 획득은 어려운 문제이다.

본 연구에서는, 재생적인 방법을 이용하여 손상된 척수 신경으로부터 신경 신호를 직접적으로 획득할 수 있는 이식형 신경 소자를 제안하였다. 신호 획득 시에 염증 반응에 의해 발생할 수 있는 부정적인 효과를 억제하기 위해, 근래에 들어 점차 항염증 효과가 밝혀지고 있는 그렐린(ghrelin)을 수화젤 스캐폴드를 통해 신경소자에 적용하였다. 10nM 농도의 아가로즈(agarose) 스캐폴드를 전임상 이식 실험을 통해 이식하여 재생 효과를 확인해 본 결과 랫(rat)의 운동 기능에 통계학적으로 의미 있는 회복을 확인할 수 있었다.

추가로, 척수의 손상 수준을 모니터링할 수 있는 이식형 신경 센서를 제안하였다. 제안한 센서는 신경 교상흔의 주요 물질로써 신경의 재생을 억제하는 것으로 보고된 CSPG (chondroitin sulfate proteoglycan)의 양을 측정할 수 있다. 제안한 센서의 가능성을 확인하기 위하여 1~20 $\mu$ g/ml 농도 범위의 CSPG의 양을 센서로 측정해 보았다. 그 결과 신경의 성장을

억제하는 수준인  $10\mu\text{g/ml}$  농도의 CSPG를 충분히 측정할 수 있음을 확인할 수 있었다.

여섯 개의 시브형 신경 전극을 가진 폴리이미드에 기반한 연성 신경 소자를 MEMS 공정을 통해서 제작하였다. 제작한 소자의 전기화학적 임피던스를 삼전극법을 이용하여 측정하였으며, 1kHz에서  $17.9\text{k}\Omega$ 의 낮은 임피던스 값을 얻어 신경 신호의 측정에 문제가 없음을 확인하였다. 소자의 모든 전극은 살아 움직이는 쥐의 몸에 단단히 고정할 수 있도록 특별히 고안된 인터페이스 보드에 연결되어, 연성 기관 커넥터를 통해 외부로 연결되도록 하였다. 소자가 이식된 쥐는 통상적인 후관리를 받았으며 1개월 이상 생존하였다.

신경 신호 측정을 위한 전임상 실험을 수행하였다. 랫을 마취한 후 이식한 신경 소자의 인터페이스보드에 신호 측정 장비의 커넥터를 연결하였다. 부드러운 솔을 이용하여 쥐의 하부 다리를 자극함으로써 강제적인 신경 신호를 형성하였고, 이 방법을 통해  $200\sim 400\mu\text{V}$  크기의 신경 신호를 획득할 수 있었다. 주파수 영역의 분석에 따르면, 피크 주파수의 범위는 500Hz에서 1kHz의 범위에서 나타났으며, 자극에 의한 신경 신호임을 확인할 수 있었다. 본 연구를 통해 제안한 신경 소자는 추후 척수 손상 장애인을 위한 인공 보철의 신경 인터페이스로 활용 가능할 것으로 기대된다.

**색인어:** 척수 손상, 신경 재생, 척수 손상 모니터링, 신경 인터페이스, 신경 신호 획득

**학번:** 2007-30839

# 목차

요약문 .....	i
목차 .....	iii
그림 목차 .....	ix
표 목차 .....	xii
1. 서론 .....	1
1.1. 연구 배경 .....	1
1.2. 조직 공학 및 신경 전극 연구의 동향 .....	5
1.2.1. 조직 공학 연구 동향 .....	5
1.2.2. 신경 전극 연구의 동향 .....	6
1.3. 연구의 목적 .....	10
1.4. 연구의 수월성 .....	11
1.5. 논문의 구성 .....	12
2. 척수 신경 재생용 스캐폴드 .....	14
2.1. 스캐폴드의 디자인 .....	14
2.1.1. 스캐폴드 재질의 선택 .....	14
2.1.2. 신경 재생 약물의 선택 .....	18
2.1.3. 스캐폴드의 구조 설계 및 제작 .....	20
2.2. 전임상 이식 수술 .....	23
2.3. 기능 회복 테스트 .....	25
2.4. 기능 회복의 의미 .....	27
2.5. 조직학적 검증 .....	28
2.5.1. 조직 처리 과정 .....	28

2.5.2. 조직 염색 결과 .....	30
2.6. 스캐폴드 전임상 이식 실험의 결론 .....	32
3. 척수 손상 평가용 이식형 신경 소자 .....	34
3.1. 척수 손상 평가 센서의 개념 및 원리 .....	34
3.1.1. Chondroitin Sulfate Proteoglycan (CSPG) .....	34
3.1.2. CSPG 센서의 개념 .....	35
3.1.3. CSPG 센서의 원리 .....	37
3.2. 나노와이어 특성 평가 .....	37
3.2.1. 나노 와이어의 종류 .....	37
3.2.2. 나노와이어 그물망의 제작 .....	38
3.2.3. 나노와이어 임피던스 특성 평가 .....	41
3.2.4. 나노와이어 독성 평가 .....	42
3.2.5. 나노와이어 세포 형상 평가 .....	45
3.2.6. 나노와이어 특성 실험 결론 .....	47
3.3. CSPG 센서의 제작 .....	47
3.3.1. CSPG 센서의 연성 기판 선택 및 공정 조건 .....	47
3.3.2. Polyimide의 금속 배선을 위한 접착력 향상 .....	48
3.3.3. Polyimide 식각 조건 .....	50
3.3.4. CSPG 센서의 제작 공정 .....	51
3.4. CSPG 센서 측정 .....	53
4. 척수신경 신호 측정용 이식형 신경 소자 .....	55
4.1. 신호 측정용 신경 소자의 설계 .....	55
4.1.1. 신호 측정용 신경 소자의 개념 및 신호 측정 원리 .....	55
4.1.2. 시브형태 신경 전극의 설계 .....	57

4.1.3. 시브형태 신경 전극의 공정 설계 .....	58
4.2. 스캐폴드와 시브형태 신경 전극의 일체화 .....	60
4.3. 신경 소자 이식 수술 .....	65
4.3.1. 신경 소자의 척수 고정법 .....	65
4.3.2. 신경 소자 인터페이스 보드 고정법 .....	67
4.4. 신경소자의 신경 신호 측정 .....	72
4.4.1. 신경소자의 임피던스 측정 .....	72
4.4.2. 신경 신호의 측정 방법 .....	73
4.5. 신경 신호 측정 결과 분석 .....	75
4.5.1. 측정된 신경 신호 .....	75
4.5.2. 신경 신호의 주파수 분석 .....	79
5. 결론 .....	83
5.1. 결론 .....	83
5.2. 추후 과제 .....	85
ABSTRACT .....	96
감사의 글 .....	99



## 그림 목차

그림 1. 제안한 연구가 타 연구에 비해 가지는 수월성을 도시한 그림.	12
그림 2. 척수 신경 재생용 스키펴드의 구조 및 제작 형상	21
그림 3. 스키펴드 제작용 두랄루민 틀	22
그림 4. 척수 신경 재생용 스키펴드 제작 과정 모식도	22
그림 5. 스키펴드 삽입 수술의 모식도	23
그림 6. 이식 수술 과정 사진	24
그림 7. 스키펴드 이식 실험의 기능회복 검사를 위한 BBB 테스트 결과 그래프	26
그림 8. BBB 테스트의 평가 지표 [60]	28
그림 9. Ghrelin 샘플과 vehicle 샘플의 적출된 척수의 비교 사진	29
그림 10. Cresyl staining을 수행한 스키펴드의 염색 사진	31
그림 11. 채널 내부의 신경 조직 확대 사진	32
그림 12. 제안하는 CSPG 센서의 개념도	35
그림 13. Cover glass 위에 성장시킨 그물망 나노와이어의 SEM 형상	40
그림 14. 나노와이어의 임피던스 특성 측정 결과 그래프	42
그림 15. ZnO 나노로드의 독성 평가 결과	44
그림 16. 은 나노와이어의 독성 평가 결과	44
그림 17. CNT의 독성 평가 결과	44
그림 18. 나노와이어의 형광 염색 결과	46
그림 19. CSPG 센서의 제작 공정 흐름도	52
그림 20. 제작한 CSPG 센서의 형상	52
그림 21. CSPG에 대한 센서의 저항값 변화 측정 그래프	54

그림 22. 제안하는 척수신경 신호 측정용 이식형 신경 소자의 구조도	56
그림 23. 도식화 한 제안된 신경 소자의 특징	56
그림 24. 시브형태 신경 전극의 구조	58
그림 25. 신경 전극의 MEMS 제작 공정 흐름도	59
그림 26. 일체화 몰드의 형상	61
그림 27. 몰드 틀을 이용한 일체화 과정도	62
그림 28. 시브 전극과 일체화된 스캐폴드 형상	62
그림 29. 수정된 디자인의 일체화용 몰드 구조	63
그림 30. 몰드에 가공 제작한 채널 형상용 pipe의 사진과 일체화된 신경 소자의 사진	64
그림 31. 일체화된 신경 전극의 모습	64
그림 32. 척수에 신경소자를 고정하기 위한 방법 비교	66
그림 33. 신경전극과 측정 기기의 인터페이스 보드의 구조	68
그림 34. 이식 수술 진행 과정 및 인터페이스 고정 시도 방법	69
그림 35. Rat jacket을 이용하여 인터페이스 보드를 고정하는 수술법	70
그림 36. 인터페이스 보드 보호를 위해 변경하여 rat jacket에 부착한 신경 소자의 사진	71
그림 37. 전극의 이식 수술 과정도. (a) 척수의 절단 (b) 전극의 삽입 (c) 기준 전극의 고정 (d) 봉합 및 rat jacket을 이용한 인터페이스보드의 고정	72
그림 38. 제작한 신경 전극의 임피던스 측정 결과 (1kHz에서 17.9kΩ)	73
그림 39. 쥐 하체에 브러쉬를 이용한 촉각 신경 자극을 가하여 신경 신호를 발생시키는 모습	75
그림 40. 자발적으로 발생한 신경 신호의 측정 그래프	76

그림 41. 브러쉬를 이용한 촉각 신경의 자극 시 발생한 신경 신호의 측정 그래프 .....	78
그림 42. 브러쉬 자극 시 짧은 시간 내에 연속적인 신호가 발생한 경우의 신경 신호의 측정 그래프 .....	79
그림 43. 자발적으로 발생하는 신경 신호의 주파수 분석 .....	80
그림 44. 브러쉬 자극에 의해 발생한 신경 신호의 주파수 분석 .....	81

## 표 목차

표 1. 척수 손상의 기능회복을 위한 시술 방법 .....	4
표 2 . 신경 신호 획득을 위한 신경전극 연구 .....	9
표 3. 신경 재생용 스캐폴드로 선택 가능한 재질의 종류 및 장단점 ...	17
표 4. 신경 재생용 약물의 특징 .....	19
표 5. 나노와이어의 종류 및 저항변화 특성 [63] .....	38
표 6. Polyimide의 금속 박막 접착력 향상을 위한 플라즈마 처리 조건 및 결과 .....	50

# 1. 서론

## 1.1. 연구 배경

척수는 뇌와 신체 내의 모든 조직, 기관과의 연락 통로 역할을 비롯하여 근육 조직의 활동을 지배하는 신체 내에서 가장 중요한 신경이다. 따라서 척수가 손상되면 손상 부위 하단부의 운동 및 감각 기능이 영구적으로 마비된다 [1-3]. 그러나 말초 신경계와는 달리 중추 신경계인 척수는 뇌와 함께 한 번 손상을 받게 되면 신경 재생이 제한적이어서, 치명적인 손상을 받는 경우 신경 재생이 불가능한 특징을 가진다. 특히 척수 손상이 치명적인 이유는 척수 손상에 의해 다양한 합병증을 초래하기 때문이다. 척수 손상 환자는 평균 90% 이상이 40년 이상 생존하기 때문에 사회적, 인적, 경제적 손실이 크고, 환자에게 영구적인 고통을 남긴다.

현재 중추 신경이 손상된 환자의 재활이나 임상적 진단을 위하여 다양한 접근 방법의 연구가 진행 중에 있다. 가장 기본적인 방법으로 재활 운동 및 약물 치료가 있다. 이 방법은 척수 손상을 유발하는 요소를 수술로 제거하고, 척수 손상 초기의 신경 손상을 최대한 보호하는 Methylprednisolone과 같은 신경 보호(neuroprotection) 계열의 약물을 주입하는 임상적 방법이다 [4]. 수술 및 약물 이후에는 운동 기능의 퇴화를 억제하기 위해 지속적인 운동과 함께 심리적인 안정을 위한 심리 치료를 병행한다.

또 다른 방법은 세포 이식을 이용한 방법이다. 신경세포의 자가 이식 (autologous grafting) 또는 기타이식(allograft, xenograft)을 통해서 세포의

재생을 돕는다 [5]. 최근 손상된 척수 내에 주입한 줄기세포의 분화를 통해 손상된 신경을 재생하려는 시도가 이루어지고 있으나, 아직 임상실험 단계에 머물러 있다 [6].

조직 공학적인 신경 치료 접근법은 최근 가장 많이 연구되고 있는 방법 중의 하나이다. 손상된 신경을 제거하고, 신경의 선형적 재생을 돕기 위한 약물 또는 세포를 탑재한 인공적 생체 친화적 도관을 이식하여 신경 재생을 유인하는 것을 궁극적 목표로 한다 [7]. 다양한 수화젤 (hydrogel)을 비롯하여, 줄기세포(stem cell), 약물 등을 탑재하여 그 효과를 높이려는 시도가 이루어지고 있으나, 아직 동물 모델을 이용한 전임상 수준에서 주로 연구가 시도되고 있다 [8-10].

신경 재생을 직접적으로 유발하지는 않지만, 전기 자극 또는 신호 획득을 이용하여 우회적으로 손상된 신경 기능을 회복하고자 하는 노력 또한 시도되고 있다 [11]. 신경 자극술(spinal cord stimulation, SCS)은 Melzack과 Wall에 의해 관문조절설이 발표된 후 1967년에 통증치료에 적용되었다. 척수의 후각에 있는 신경 섬유에 지속적인 자극을 가함으로써 역치를 낮추어 통증을 완화하는 방법으로 가역성과 최소 침습, 낮은 부작용 등으로 임상 시술이 확대되고 있다.

신경 전극은 탐침 배열 등을 이용하여 신경 전기 신호를 직접적으로 획득하는 방법이다 [12-14]. 주로 뇌 등에서 신경 신호를 획득하기 위해 개발되었으며, 뇌와 신경 운동 간의 관계를 파악하기 위한 용도로 개발되고 있다.

그러나 이러한 다양한 접근 방법에도 불구하고 기존의 척수 치료 방법

들은 한계점을 가지고 있어, 척수의 완전 치료에 큰 어려움을 겪고 있다. 재활/약물 치료 방법의 경우 증상 완화의 보조치료적인 방법으로 치료 초기에 손상이 심해지는 것을 억제하는 것을 주 목적으로 하기 때문에 장기적인 회복 측면에서 그 효과를 기대하기 어렵다. 세포이식 치료방법의 경우 이식한 세포의 체내 생존율이 낮아 임상적인 효과의 예측이 어려운 측면이 있다. 특히 면역 반응 또는 압 전이 등의 치명적인 부작용이 발생할 위험이 있다. 조직공학적인 방법은 미래에 가장 촉망받고 있는 치료방법이나 아직 다양한 재질과 약물 등에 대한 임상적 측면이 증명되지 못해 많은 전임상 및 임상연구가 필요한 방법이어서 당장 치료에 적용하기 어려운 난점이 있다. 신경 자극 장치 및 신경전극을 이용한 방법은 척수의 직접적 치료를 위한 방법이 아닌 보조적인 방법으로써, 탐침 또는 전극을 신경에 삽입시에 생체 조직에 손상이 가해질 수 있으며, 장기적 측면에서 손상이 누적될 수 있다. 따라서 장기적 동작에 문제가 있는 것으로 알려져 있다.

이와 같이 다양한 접근 방법과 연구에도 불구하고, 여전히 척수 신경 손상의 기능회복 방법은 요원한 상황이며, 새로운 개념의 접근 방법이 필요하다.

**표 1.** 척수 손상의 기능회복을 위한 시술 방법

접근방법	시술 예	방법 및 특징	한계점
재활/약물 치료 (Rehabilitation)		<ul style="list-style-type: none"> <li>- 수술 치료</li> <li>- 신경 보호 약물 (Methylprednisolone )</li> <li>- 재활 치료 병행</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 초기 손상 보호에 주력</li> <li>- 장기적 치료효과 미미</li> </ul>
세포이식 치료 (Grafting)		<ul style="list-style-type: none"> <li>- 자가 이식</li> <li>- 동종 이식 및 이종 이식</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 이식 세포 체내 생존율이 낮음</li> <li>- 임상적 효과 예측 불가</li> </ul>
조직 공학 (Tissue Engineering)		<ul style="list-style-type: none"> <li>- 신경 가이드 용 스캐폴드</li> <li>- 재생 인자</li> <li>- 억제 인자</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 말단신경, 척수신경 재생 전임상 연구가 아직 진행중</li> </ul>
신경자극 장치 (Stimulator)		<ul style="list-style-type: none"> <li>- 전기 자극 신호 생성</li> <li>- 이식형</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 통증 완화에 주로 이용</li> <li>- 기능복원 효과는 미미</li> </ul>
신경 전극 (Neural probes)		<ul style="list-style-type: none"> <li>- 장기 안정성 문제</li> <li>- 척수 및 뇌에 대한 침습성</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 신경 조직 손상 가능성</li> <li>- 장기적 안정성 문제</li> </ul>



## 1.2. 조직 공학 및 신경 전극 연구의 동향

### 1.2.1. 조직 공학 연구 동향

조직 공학적 척수 신경 재생 연구는 크게 두 가지 접근 방법이 연구되고 있다. 한 가지 방법은 세포 재생을 돕는 세포 또는 약물을 수화젤 또는 기타 기질과 섞어서 손상 부위에 채워 넣는 방법과, 도관 형태의 인공적인 스캐폴드(scaffold)를 손상 부위에 이식함으로써 신경의 선형적 재생을 인위적으로 유도하는 방법이다 [15-25]. 두 방법 모두 말초 신경 및 척수 신경에 적용되고 있으며, 그 전임상 연구가 활발히 진행되어 어느 정도 효과가 있는 것으로 보고되고 있다.

2005년에 University of California-San Diego에서 Mark H. Tuszynski 그룹에서 발표한 논문은 스캐폴드를 이용한 신경 재생 도관의 대표적인 연구이다 [26]. 아가로즈(agarose) 수화젤을 동결 건조(freeze dry)를 수행함으로써 수화젤 내에 약 125 $\mu$ m 직경의 미세 채널을 형성하였으며, 이를 쥐의 척수에 삽입하여 척수 신경의 축삭이 재생되는 것을 확인하였다. 이 그룹은 연구를 지속하여 2006년에는 PMMA cladding을 이용하여 보다 큰 지름의 채널을 형성하는 연구를 발표하였다 [27]. 2010년에는 2006년에 발표한 스캐폴드에 Bone Marrow Stem Cell을 주입하여 연구를 발표하였으며, 신경 세포의 재생이 선형적으로 나타남을 조직학적으로 보였다 [28].

한편 척수 신경의 재생을 돕기 위한 약물 연구는 주로 신경의 재생을

돕는 것으로 알려진 신경 인자(neurotrophic factor)와 신경 재생을 억제하는 것으로 알려진 신경 억제 인자(neurotrophic inhibitor)를 제거하는 방법으로 진행되어 왔다 [29-31]. 신경 인자(neurotrophic factor)는 신경 재생과 관련된 30개 이상의 그룹으로 NT-3(neurotrophin-3), NGF(nerve growth factor), BDNF(brain derived neurotrophic factor), GDNF(glial cell-line derive neurotrophic factor) 등을 포함하며, 언급한 인자들이 주로 척수 손상에 효과가 있는 것으로 알려지고 있다. 이 중 BDNF와 NT-3가 초창기부터 가장 많이 연구되고 있으나, 최근 연구에 의하면 신경 억제 인자를 억압하는 것과 병행해야지만 원하는 효과를 얻을 수 있는 것으로 알려지고 있다.

### 1.2.2. 신경 전극 연구의 동향

신경전극의 연구는 신경 전극의 형태에 따라 탐침 형태(probe type), 나노 와이어 형태(nanowire type), 커프 형태(cuff type), 시브 형태(sieve type)으로 나뉘어 진행되고 있으며, 뇌 연에는 주로 탐침 형태가 사용되고 있고, 말초 신경 연구에는 커프 및 시브 형태가 사용되고 있다 [32-39].

탐침 형태를 이용한 연구는 뇌심부 자극술(deep brain stimulator)와 같이 뇌심부를 비롯한 뇌표면의 신경 신경 신호를 획득하기 위해 다양한 깊이와 두께로 제작되고 있으며, 주로 뇌 연구에 집중되어 있는 경향이 있다. 2006년 Nature에 Harvard Medical School에서 발표한 연구의 예가 이를 잘 보여 준다. 96개의 미세 탐침 배열을 가진 소자를 대뇌 피질 운동령에 이식한 후 감치되는 신경 신호를 획득하였다 [40]. 이를 환자의

의지에 따라 분석하여 neuromotor prostheses에 신호를 전달하는 것을 목표로 하는 연구이다.

드물게 척수에 적용한 연구의 예도 보고되었다. *Journal of Neural Engineering*에 2006년에 New Jersey Institute of Technology에서 발표한 논문에 따르면 쥐 목의 척수에 실리콘으로 제작한 미세 탐침 형태의 배열을 삽입하여 신경 신호를 감지하였다 [41-43]. 감지한 신호는 말초 신경에서 감지한 신호와 비교하여 통계적으로 유사성이 있음을 증명하고자 하였다.

나노와이어 FET을 이용한 신경 전극 연구도 보고되고 있다. Harvard University에서 2006년에 *Science* 지에 보고한 연구에 따르면 실리콘 나노와이어 FET 배열을 신경 세포에 결합시켜 신경 신호 전달을 검출하거나 자극, 억제하는 소자를 보고하였다 [44]. 신경세포 위에 배열 형태의 소자를 정렬하여 부착하였으며, 시간차를 두고 인접한 나노와이어 FET 소자에 전기 신호가 검출되었음을 확인하였다.

커프 형태의 전극은 주로 중추 신경이 아닌 말초 신경계에 적용되는 형태이나 최근 척수에도 적용하기 위한 예가 보고되었다. 2008년 *Biomed Microdevices*에 보고된 논문은 그 전형으로 PDMS를 이용한 flexible 기판에 금 재질의 전극을 형성한 후 Rat의 척수를 감싸서 적용하기 위한 전극으로, 쥐의 척수를 분리해 내어 신경 신호의 크기를 측정하였다 [45].

시브 형태의 전극은 말초 신경계의 적용만 시도되고 있으나 전극의 높은 공간적 정밀도와 절단 손상된 신경에 적용 가능한 장점이 있다. University of Cambridge의 James J. Fitzgerald 그룹에 의해 주도되어 있는

연구로서 2009년 IEEE Transactions on Neural Systems and Rehabilitation Engineering에 발표된 논문을 보면 염증 반응이 최소화 된 상태에서 말초 신경과 완전히 결합한 시브형태의 전극을 확인할 수 있다 [34]. 그러나 아직 완전한 말초 신경 신호의 획득이 보고되지는 않았다.

요약하면 신경 전극 연구는 말초 신경과 뇌, 척수 등 다양한 신경에 적용하기 위한 연구가 진행되고 있으며, 뇌와 말초 신경에 대한 연구는 상당한 진척이 있어왔다. 하지만 척수신경에 대한 적용은 아직 저조한 실정이며, 특히 직접적 신호 획득은 아직 보고된 바가 없는 실정이다.

표 2 . 신경 신호 획득을 위한 신경전극 연구

년도	그룹	목표	연구 내용																								
2006 [40]	Harvard Medical School	뇌 운동령 신호																									
2006 [41]	New Jersey Institute of Technology	취 목 척수 신경신호																									
2008 [45]	Georgia Institute of Technology and Emory University	취 척수 (in vitro)	<table border="1"> <caption>Graph Data: CAP Response Strength vs Lateral Distance</caption> <thead> <tr> <th>Lateral Distance (µm)</th> <th>MEA Stimulation at Threshold (200 µA, 500 µs)</th> <th>MEA Stimulation Above Threshold (800 µA, 500 µs)</th> <th>Exponential Fit: Turgatein stimulation at Threshold (300 µA, 100 µs)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0</td> <td>70</td> <td>70</td> <td>70</td> </tr> <tr> <td>50</td> <td>10</td> <td>45</td> <td>45</td> </tr> <tr> <td>100</td> <td>0</td> <td>15</td> <td>15</td> </tr> <tr> <td>150</td> <td>5</td> <td>10</td> <td>10</td> </tr> <tr> <td>200</td> <td>-5</td> <td>5</td> <td>5</td> </tr> </tbody> </table>	Lateral Distance (µm)	MEA Stimulation at Threshold (200 µA, 500 µs)	MEA Stimulation Above Threshold (800 µA, 500 µs)	Exponential Fit: Turgatein stimulation at Threshold (300 µA, 100 µs)	0	70	70	70	50	10	45	45	100	0	15	15	150	5	10	10	200	-5	5	5
Lateral Distance (µm)	MEA Stimulation at Threshold (200 µA, 500 µs)	MEA Stimulation Above Threshold (800 µA, 500 µs)	Exponential Fit: Turgatein stimulation at Threshold (300 µA, 100 µs)																								
0	70	70	70																								
50	10	45	45																								
100	0	15	15																								
150	5	10	10																								
200	-5	5	5																								
2009 [34]	University of Cambridge	말초 신경																									

### 1.3. 연구의 목적

현재 척수 신경 기능 회복을 위한 연구는 앞서 언급한 바와 같이 직접적인 신경 재생을 유도하는 조직공학적 방법과 신경 신호를 획득하여 인위적 신경 전달을 추구하는 두 가지 방법이 병행되어 연구되고 있다. 하지만 두 연구 모두 만족할만한 성과를 얻어 내지 못하고 있다. 조직공학적 방법의 경우 다양한 약물과 스캐폴드 구조가 시도되고 있으나, 최선의 조합이 무엇인지에 대한 의견이 여전히 분분할 만큼 그 효과가 대동소이한 실정이다. 특히 기능적 측면에서 완전한 회복이 이루어지지 않는 것으로 보고되고 있기 때문에 조직공학적 방법도 일부 기능의 회복에는 도움이 되나, 척수 신경 손상의 대안이 되지는 못하고 있다. 신경 신호를 획득하는 방법의 경우 인공적으로 제작한 소자를 신경 조직에 삽입해야 하기 때문에 장기적인 신경 손상을 어떻게 보완할 수 있는지가 주요 문제이며, 이 문제 역시 해결되지 못하고 있다.

위와 같이 두 방법 모두 근본적인 해결 방법이 되지 못하고 있는 실정이지만, 두 가지 접근 방법은 상호 보완적인 측면이 있음에 주목하였다. 즉 조직 공학적인 연구 접근 방법은 신경 재생을 도우나 기능적 회복이 완전하지 못하며, 신경 전극 방법은 기능 회복을 보조할 수 있으나, 신경 손상 측면에서 불리하다. 따라서 조직 공학적인 방법과 신경 전극 방법이 복합적으로 적용된 신경 획득 소자를 개발한다면, 두 접근 방법의 문제점을 상호 보완할 수 있는 한편 획기적인 신경 신호 획득 방법이 될 수 있다.

따라서 본 연구는 스캐폴드 및 약물을 이용하여 신경 재생을 돕는 조

직공학적 방법과 신경 전기 신호를 직접적으로 획득할 수 있는 신경 전극을 결합하여 손상된 척수 신경으로부터 신호를 획득할 수 있는 소자를 연구하는 것에 주안점을 두었다.

#### 1.4. 연구의 수월성

제안한 신경 소자의 가장 큰 특징은 신경 신호를 획득할 수 있는 신경 전극 구조에 신경 재생을 유도할 수 있는 스캐폴드 구조가 결합되어 있는 구조라는 점이다. 그동안 별도로 재생에만 초점을 맞추어 진행되어 왔던 신경 재생용 스캐폴드 연구를 신경 신호 획득용 인터페이스 소자에 결합함으로써 그림 1과 같이 높은 재생 효과를 가지면서도, 높은 선택성을 유지할 수 있다.

신경 신호의 획득의 대상 측면에서도 차별성이 있다. 즉, 손상된 신경을 스캐폴드의 채널 내부로 재생시킴과 동시에 재생된 신경으로부터 신경 신호를 획득하기 때문에 손상된 척수 신경으로부터 신경 신호 획득이 가능하다. 이는 기존의 신경 소자로는 불가능 한 것이며, 처음으로 제안된 개념이다. 특히 신호 획득과는 별도로 스캐폴드 내의 도관을 통해 재생된 신경 신호가 연결될 수 있기 때문에, 신경 재생을 통한 기능 회복 측면에서도 상당히 유용하다.

본 연구의 수월성은 위와 같이 새로운 개념의 소자를 제안하고, 이를 통해 기존의 신경 소자가 해결 불가능했던 문제에 대한 해답을 제시함으로써 새로운 영역의 연구를 개척했다는 점이다.

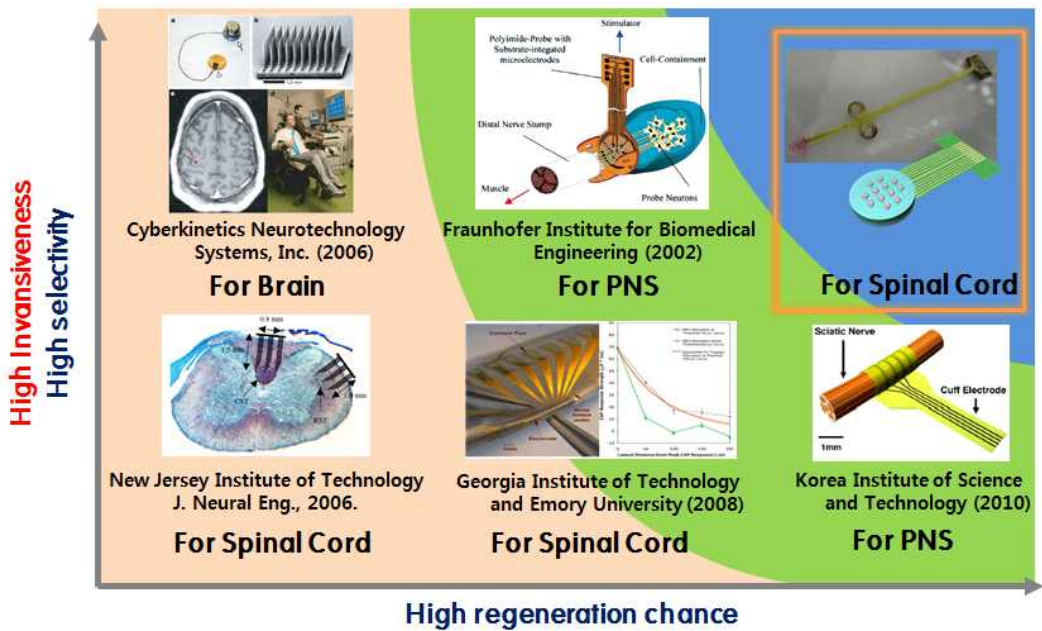


그림 1. 제안한 연구가 타 연구에 비해 가지는 수월성을 도시한 그림.

### 1.5. 논문의 구성

신경 재생을 위한 조직 공학적 방법과 신경 전기 신호를 획득하기 위한 신경 전극 방법 각각에 대한 연구를 진행하였다. 그리고, 두 방법을 결합하여 최종적인 형태의 소자를 제작한 후 최종적으로 전임상 신호 측정을 하는 형태로 연구를 진행하였다. 또한 이러한 신경 소자와 병행하여 신경 손상 정도를 정량적으로 측정하기 위한 이식형 소자의 연구를 진행하였다.

우선 손상된 척수 신경을 재생하기 위해서는 재생을 돕는 약물이 탑재된 생체 친화적인 재료의 스캐폴드 구조에 대한 연구가 선행되어야 한다. 본 논문에서는 해당 스캐폴드 구조를 제작하기 위한 문헌 조사를 바



탕으로 재질 및 약물을 선정하였다. 또한 선정된 물질을 바탕으로 스캐폴드를 제작하여 쥐(rat)을 이용한 전임상 실험을 수행하였다. 한 달 이상의 장기간의 기간에 걸쳐 기능회복여부를 관찰하였으며, 조직학적으로 분석하여 신경이 스캐폴드에 제대로 침투하였는지를 확인하였다.

재생 성능이 평가된 스캐폴드 연구와 병행하여, 미세 소자 제작 기술인 MEMS(microelectromechanical Systems) 기술을 활용하여 시브 형태의 전극을 제작하고, 그 성능을 in-vitro 상에서 평가하였다. 제작을 위해 쥐의 척수 손상 모델에 적합한 형태를 선정하였으며, in-vitro 상에서의 전극 성능을 테스트 하였다.

최종적으로 신경 재생용 스캐폴드와 시브형 신경 전극을 결합하기 위한 장치를 고안하였고 이를 통해 이식형 신경 소자를 제작하였다. 제작한 신경 소자는 in-vivo 상에서 신경 신호 획득 실험을 진행하였다.

한편 척수의 손상정도를 정량적으로 모니터링하기 위해 탄소나노튜브(carbon nanotube, CNT)를 이용한 신경 손상 모니터링용 이식형 신경 소자 또한 설계하고 제작하였다. 이를 위해 CNT의 독성 검사를 진행하였으며, 제작한 소자는 척수 손상 시에 발생하는 신경교상흔의 주요 구성물질인 CSPG(chondroitin sulfate proteoglycan)의 농도에 따라 저항값이 변화하는 것을 관찰하였다.

## 2. 척수 신경 재생용 스캐폴드

### 2.1. 스캐폴드의 디자인

#### 2.1.1. 스캐폴드 재료의 선택

척수 신경의 재생을 돕고, 신경의 재생을 임의의 방향이 아닌 선형적으로 유도하기 위해서는 적절한 스캐폴드의 재료 선택이 필수적이다. 현재까지 다양한 재질이 시도되어 왔으며, 이외에도 선택 가능한 재료의 종류는 매우 다양하다. 재료의 종류를 크게 나누어 보면 agarose, alginate, hyaluronic acid와 같은 수화젤(hydrogel)이 있으며, collagen, matrigel, fibrin과 같은 유사 세포외기질(ECM)과 PGA, PLA, PHB와 같은 중합체(polymer)가 있다 [46-49].

수화젤은 재질은 링크로 연결된 분자 구조 내에 빈공간의 대부분을 물이 차지하고 있는 형태의 재료이다 [50-52]. 주로 물에 녹여서 식히거나 (agarose), 경화제를 섞어서(alginate) 경화를 유도 한다. 물이 구성요소의 대부분을 차지하기 때문에 저농도의 수화젤은 대체적으로 기계적 강도가 약하나, 농도를 높이면 형태를 오랫동안 유지할 수 있을 정도로 상당히 단단해지며, 재료 내의 공간(pore) 크기는 농도에 반비례한다 [51]. 상당한 빈 공간을 내부에 가지고 있기 때문에 약물 또는 세포를 탑재하기 용이한 장점이 있으며, 용융 상태에서 모양을 만들어 경화시키는 방법으로 쉽게 원하는 모양을 형성할 수 있다.

유사 세포외 기질 재료는 주로 세포 배양 등에서 인공적인 세포 환경을 만들기 위해 사용하는 재료이다 [53-55]. 대부분 기계적 강도가 매우

약하여 형태를 유지할 수 없다. 하지만, 세포와의 친화력이 우수하고 세포가 쉽게 재질 내부로 침투할 수 있다. 또한 세포와 함께 섞여있을 때 어느 정도 3차원적인 구조를 유지할 수 있다. 가열 또는 경화제 처리 등이 필요없고 체내 온도에 도달하면 자연적으로 경화되기 때문에 약물이나 세포를 혼합하기도 쉬운 장점이 있다.

중합체 계열은 링커에 의해 고분자가 결합되어 있는 구조이다. 수화젤이나 유사 세포외기질 재질에 비해 대부분 기계적으로 매우 안정되어 있다. 하지만 재질 표면에 작용기가 부족하여 세포와의 접착력이 현저히 떨어지거나, 또는 생체 내에서 빠르게 분해되어서 형태가 없어지는 등의 문제점이 있다. 이외에도 약물이나 세포를 담기도 어렵고, 중합체로 만들기 위해 UV 등을 조사(radiation)해야 하는 등의 문제점이 있다.

이상의 재질 계열 중에서 스캐폴드의 재질 선정하기 위해 고려해야 하는 사항은 다음과 같다. 첫째, 스캐폴드의 외부를 구성하는 물질은 기계적 안정성과, 세포 접착력이 우수해야 한다. 기계적 안정성이 약할 경우 전극과 일체화 된 형태가 무너지게 되고, 또한 신경 재생을 가이드 하기 위한 도관 형태가 파괴되어 원하는 목적을 달성하기 어렵다. 하지만 기계적 강도(stiffness)가 신경 조직(15~60kPa)보다 너무 강하게 되면 신경조직이 변형될 때 스캐폴드가 손상을 주게될 수 있다 [56-58]. 따라서 최소한 2달 이상 체내에서 형태를 유지할 수 있되 신경 조직과 가능하면 유사한 기계적 강도로 조절할 수 있어야 한다. 또한 장기간의 재생 후 척수 신경과 밀착되어 신경 조직이 재생되면 스캐폴드 사이에 간극이 형성되면 안된다.

둘째, 약물 또는 세포 등과 쉽게 섞을 수 있어야 한다. 스캐폴드는 필수적으로 신경 재생을 위한 약물 또는 세포를 포함하여야 하기 때문에 표면에 충분한 작용기가 있거나 내부에 최소 수백 nm 이상의 공간이 있어야 한다.

셋째, 형태를 원하는 형태로 쉽게 만들 수 있어야 한다. 전극과 결합시키기 위해서는 신경 재생을 유도하는 도관과 전극의 노출 부위를 잘 정렬할 수 있도록 제작하여야 한다. 이를 수행하기 위해서는 몰딩(molding)과 같이 간단한 방법으로 형태의 제작이 가능할수록 좋다.

이와 같은 조건을 고려할 때 스캐폴드의 재질로 적합한 것은 수화젤 계열이며, 그 중 아가로스(agarose)가 가장 나은 것으로 결론을 내렸다. 아가로스는 농도에 따라 기계적 강도를 쉽게 변화시킬 수 있다(2wt%에서 약 200kPa, 3wt%에서 약 400kPa) [50-52]. 또한 가열하여 용융한 후 원하는 형태의 몰드에 주입하여 냉각시키면 쉽게 형태를 고정할 수 있다. 수화젤 내부에 충분한 포어가 형성되어 있기 때문에 약물들을 쉽게 담을 수도 있다.

표 3. 신경 재생용 스캐폴드로 선택 가능한 재질의 종류 및 장단점

재질	장점	단점
Collagen [20]	기능 회복을 돕는 것으로 보고됨	신경 재생의 물리적 장벽이 될 수 있음 독성의 가능성
Fibronectin [23]	절단된 축삭을 가이드하는 것으로 보고됨	NGF와 복합적용시에 효과가 없다는 보고가 있음
Fibrin [23]	말초신경의 재생을 도움 FGF-1과 함께 채웠을 때 말초신경 회복이 보고됨	
Alginate [15-16]	면역 반응이 억제되는 것이 보고됨	사용을 위해 초정제가 필요함
Agarose [17-19]	NGF와 복합시 신경 재생에 효과가 있는 것으로 보고됨 축삭 재생에 효과가 있는 것으로 보고됨 신경 세포와 접착력이 좋은 것으로 알려짐	
Gelatin [21]	세포 접착력이 우수함 주로 의학 응용에 활용되어 왔음	체 내에서 천천히 분해됨
Matrigel [21-23]	복잡한 세포외기질(ECM)과 유사한 조성을 가짐 Schwann cell과 함께 작용하여 효과가 있는 것으로 보고됨	
Hyaluronic acid [15]	독성이 없고, 생체친화적임	SCI의 복원을 위한 추가적 연구가 필요함

Chitosan [15-16]	독성이 없고, 생체친화적임	SCI 연구에 적용된 바 가 없음
Poly(glycolic acid) / Poly(lactidic acid) [24]	조직 공학에서 임시적인 ECM으로 사용됨	생체 내에서 분해 속도(degradation rate)를 정확히 조절하기가 쉽지 않음
Polyethylene glycol [15-16]	친수성 폴리머임 신경 보호 특성이 있음	

### 2.1.2. 신경 재생 약물의 선택

신경 재생용 약물로 가능한 우선 순위 후보군은 현재까지 많은 연구가 진행되어져 온 NF(neurotrophic factors)이다 [29-30]. 하지만 해당 약물군은 많은 연구 결과에도 불구하고 재생을 유도하는 효과가 제한적이다. 따라서 NF를 제외한 다른 약물군을 조사하였다. 표 4에는 조사한 약물 군의 특징이 정리되어 있는데, 해당 약물 중 ghrelin을 선택하였다. Ghrelin은 섭식 중추를 자극하는 호르몬으로 널리 알려져 있으나, 최근 Yale University 연구팀에 의하여 파킨슨병의 발병과 관련있는 도파민 신경 세포를 보호하는 효과가 있는 것으로 확인되었다 [59].

또한 ghrelin은 호르몬 계열이므로 적은 양으로도 상당한 효과를 기대할 수 있다. 반면 기타 후보 약물들은 주로 음용하거나 주사 주입을 통하여 생물체 내에 과량을 중복적으로 투여해야만 한다. 따라서 스캐폴드의 하이드로젤 내부에 저장되는 미량의 약물로는 효과를 보기가 어려울

것으로 판단하였다. 이와 같은 측면을 고려하여 ghrelin을 선정하였다.

**표 4. 신경 재생용 약물의 특징**

약물명	특징
Substance P	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 신경 전달 물질</li> <li>- 신경계를 경유하지 않고 직접 골수 중간엽세포 (mesenchymal)를 유도하여 손상조직 치유에 관여</li> </ul>
VPA (Valproic acid)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 신경계나 정신계 치료를 사용되는 경련 억제제</li> <li>- ER stress를 block하는 효과</li> </ul>
Prozac (Fluoxetine)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 미국 FDA에 승인 받은 세계적으로 사용되는 항우울제</li> <li>- Metallo protease MMP-9의 파괴를 방지하는 효과</li> </ul>
Glivec	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 1999년 스위스 노바티스사에 의해 개발된 만성 골수성 백혈병(CML) 치료제</li> <li>- Neural protection 효과</li> </ul>
Ghrelin	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 위장에서 생산되는 호르몬, 뇌의 시상 하부에 존재하는 뉴로펩타이드 Y(NPY)를 활성화시켜 섭식중추를 자극함</li> <li>- 파킨슨병의 발병과 관련된 도파민 신경 세포의 보호효과</li> </ul>

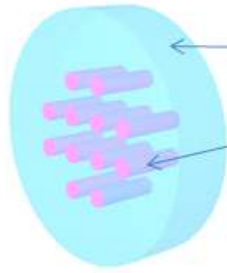
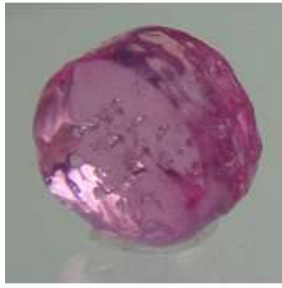
### 2.1.3. 스캐폴드의 구조 설계 및 제작

척수 신경 재생용 스캐폴드는 척수 신경의 재생을 선형적으로 가이드 할 수 있는 형태여야 한다. 이를 위해서는 스캐폴드를 관통하는 다수의 채널이 있어야 하며, 스캐폴드의 지름은 신경 세포를 지지할 수 있는 각종 세포들이 들어올 수 있도록 충분한 지름을 가져야 한다. 제안한 스캐폴드는 agarose 2wt%로 제작하였으며, 지름 300 $\mu$ m의 채널이 300 $\mu$ m 간격으로 형성되어 있다. 두께는 약 2mm이며, 전체 지름은 4mm로 약 3mm 지름의 렛의 척수에 긴밀하게 밀착될 수 있도록 디자인 하였다.

Agarose 스캐폴드의 형성 제작을 위해서는 두랄루민(duralumin) 틀을 이용한 cast molding 기법을 사용하였다. 틀은 아가로즈와의 접촉이 잘 이루어지지 않아 분리가 용이하도록 산화처리가 되어 있다. 원통의 내경은 아가로즈 지름과 같게 4mm로 설계되었으며, 길이는 17mm로 제작하여 원하는 길이만큼 메스로 잘라 스캐폴드를 제작할 수 있도록 하였다. 틀의 캡 부위에는 채널 형성용으로 원통 내부에 삽입되는 300 $\mu$ m 직경의 핀을 고정할 수 있도록 300 $\mu$ m 간격으로 홈이 형성되어 있다.

스캐폴드의 제작과정은 우선 agarose(Seakem LE Agarose, Lonza)를 2wt%의 농도로 distilled water에 녹인다. 녹인 agarose 100°C 이상의 온도에서 약 30분간 충분히 용융 시킨다. 이후 용융된 agarose 내에 스캐폴드 채널 형성용 핀이 조립되어 있는 몰드 틀을 넣고, 용융된 agarose 내에서 핀셋을 이용하여 조립하였다. 틀에 조립 시 스캐폴드 내부에 기포가 발생하지 않도록 주의를 기울여 조립하였다. 틀을 조립한 후 온도를 식힘으로써, 스캐폴드를 제작하였다.





- **2wt% agarose**
- 두께 2mm, 지름 4mm 원통형
- **Ghrelin + Matrigel**
- 채널 지름 300 $\mu$ m

그림 2. 척수 신경 재생용 스캐폴드의 구조 및 제작 형상

채널 내부에는 신경의 재생을 도울 수 있도록 10nM의 Ghrelin을 matrigel에 혼합하여 주입하였다. 사용한 matrigel (BD Science, MA USA)은 기타 효과를 배제하기 위하여 GFR(growth factor가 reduced) 특성을 가지면서, in vivo 상에서 형상을 유지하도록 농도가 18~22mg/ml로 높은 HC(high concentration) 제품을 사용하였다. Matrigel은 22°C에서 35°C 사이에 급속히 경화되는 특성이 있으므로 모든 주입과정은 냉각된 상태에서 진행하였다. 차갑게 냉각된 pipetman 및 tip으로 ghrelin이 혼합된 matrigel을 스캐폴드의 채널 내에 주입한 후 37°C의 incubator에서 5분 정도 두어 경화를 진행하였다. 제작한 스캐폴드는 ghrelin 약물 효과의 감소를 최소화하기 위하여 제작 후 하루 이내에 이식 수술을 진행하였다.

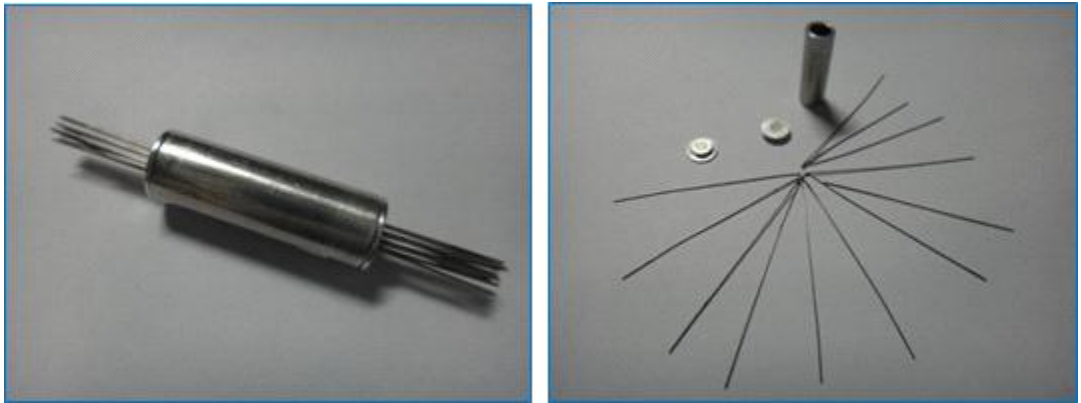


그림 3. 스캐폴드 제작용 두랄루민 틀

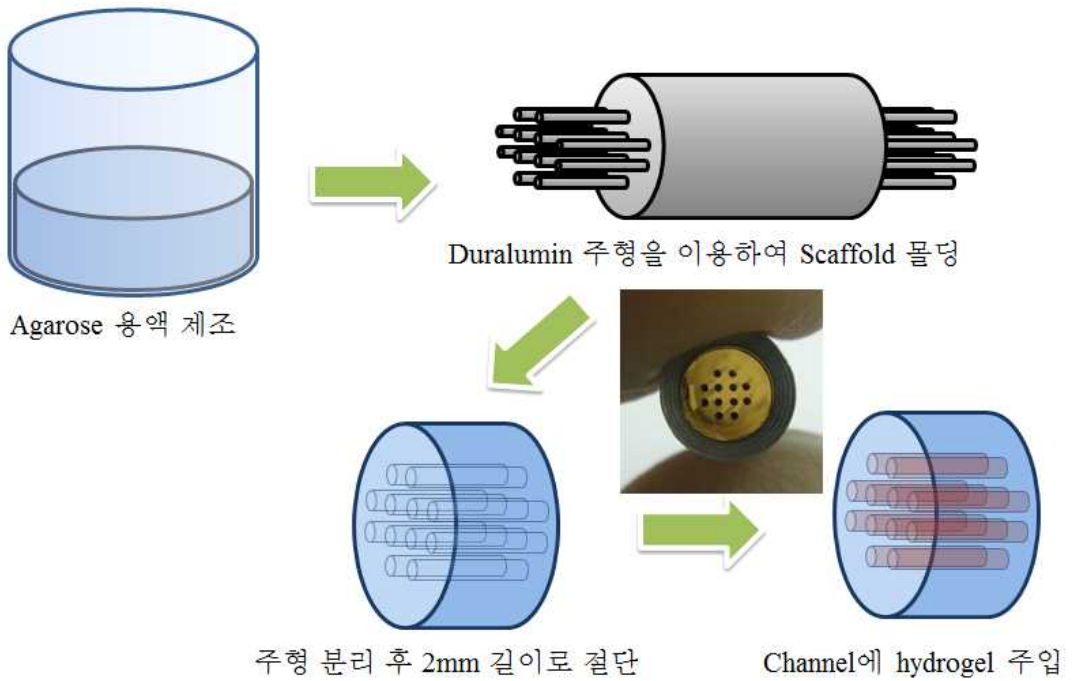


그림 4. 척수 신경 재생용 스캐폴드 제작 과정 모식도

## 2.2. 전임상 이식 수술

제작한 스캐폴드는 기능회복 테스트를 위한 전임상 이식 수술을 진행하였다. 실험을 위해 ghrelin이 포함되어 있는 ghrelin 샘플과 더불어, 대조군으로써 제작과정에서 ghrelin 혼합 과정만 생략한 vehicle 샘플 두 종류를 준비하였다. 이식 수술은 7주령에 몸무게가 약 240g인 SD (Sprague-Dawley) male rat을 대상으로 하였으며, 전임상 동물 모델로는 T9 (thoracic 9) 척수의 오른쪽 절반이 제거된 hemisection lesion model을 사용하였다. 모든 수술은 chloral hydrate 4% (in 1XPBS)로 마취된 상태에서 진행하였다.

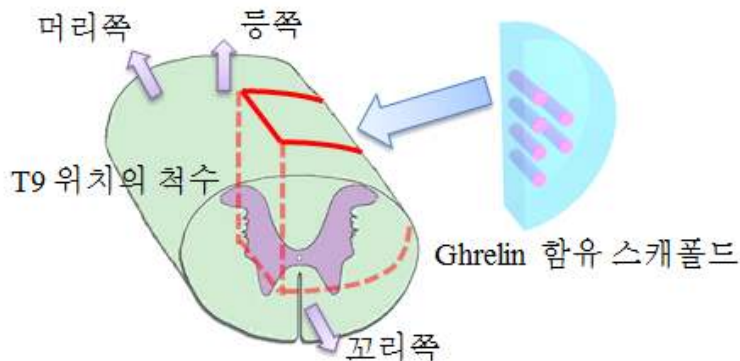


그림 5. 스캐폴드 삽입 수술의 모식도

이식 수술은 다음과 같은 순서로 진행하였다. 먼저 T9~T10 위치의 척추(vetebra)를 추궁절제(laminectomy)하였다. 이후 척수의 경막(dura mater)를 찢어낸 뒤, T9 척수의 오른쪽 절반을 미세 가위를 이용하여 잘라내고, 흡입기 (aspirator)에 연결된 피펫 팁을 이용하여 잔류 척수 조직을 흡

입제거 하였다. 이 때 2mm 길이의 스캐폴드가 최대한 밀착되어 척수 사이에 위치되도록 하기 위하여 약 1.8mm로 약간 작게 제거하였다. 이후 거즈를 이용하여 충분한 지혈을 하고, 최종적으로 절개된 척수의 빈 공간에 vehicle 샘플과 ghrelin 샘플을 번갈아 가면서 이식하였다. 이식한 뒤 튀어나온 스캐폴드의 모서리 부분을 약 1mm 가량 절단하고, 스캐폴드가 튀어나오지 않도록 크기 6mm x 6mm에 두께가 약 0.1mm가 되도록 제작한 2wt% agarose film을 스캐폴드 위에 덮었다.

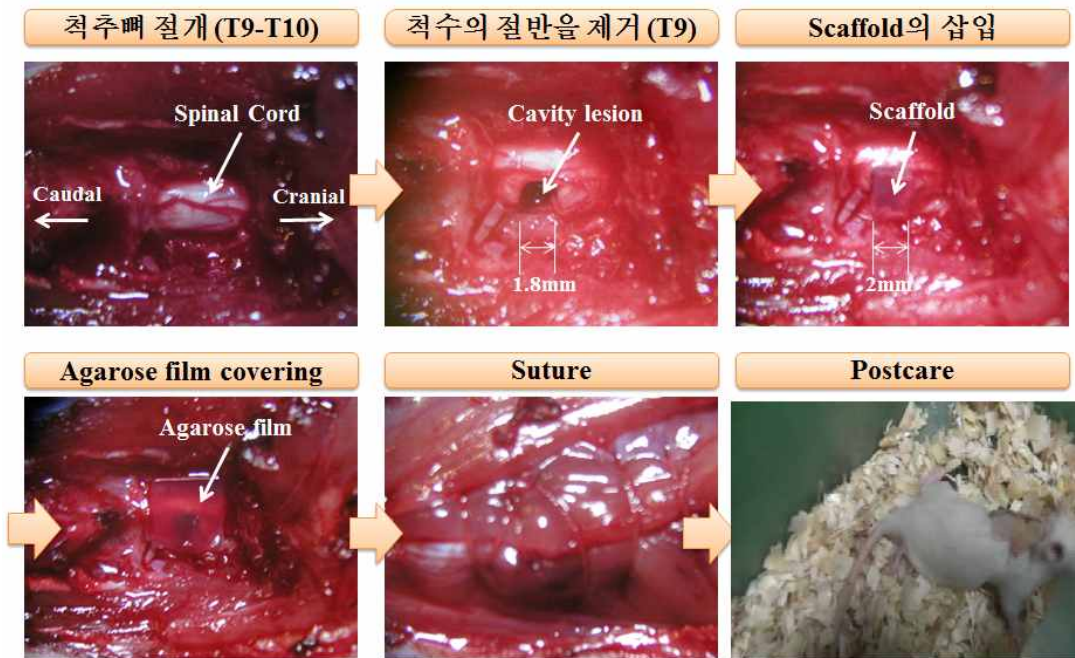


그림 6. 이식 수술 과정 사진

최종적으로 봉합한 후 보호 관찰을 실시하였다. 척수 손상을 받은 쥐는 기능 회복이 이루어질 때까지 배뇨 기능이 떨어지게 되므로 일정 수

준의 기능 회복이 될 때까지 인위적인 배뇨(urination)를 시켜주었다. 수술한 쥐는 최소 1달 이상 생존하였다.

### 2.3. 기능 회복 테스트

Vehicle 샘플과 ghrelin 샘플을 이식한 쥐의 기능회복 비교를 위해 1996년에 D. Michele Basso, Michael S. Beattie, Jacqueline C. Bresnahan 3명에 의해 제안된 쥐의 운동기능 비교를 위한 점수체계를 채용하였다 [60]. 이 점수 체계는 제안자 3명의 이름을 따서 BBB 테스트로 일컬어지며, 초기 관절 운동 기능의 회복부터, 걷는 능력의 밸런스 여부까지 0점에서 21점까지 세분화되어 있다. 주요 분기점은 10점에서 12점 사이로, 10점부터 쥐는 자신의 무게를 지탱하여 불안정하게나마 걷기 시작하며, 12점이 넘어가면 앞발과 뒷발을 조화롭게 움직여서 걷기 시작하는 것이 가능해진다. 따라서 BBB 테스트의 점수는 10점을 넘는지 여부와 12점을 넘는지 여부가 기능회복의 주요 관심사이다.

BBB 테스트는 일주일 간격으로 5주간에 걸쳐서 진행되었으며, 측정자료 중 수술 과정의 오류로 인해 기능 회복이 지나치게 빠르거나 회복이 일어나지 않는 샘플의 자료는 삭제한 후 평균값을 구하였다. 운동 기능 회복 여부를 정량적으로 측정하기 위한 BBB 테스트는 5주까지만 진행하였는데, 그 이유는 실질적으로 중대한 기능 회복이 한 달 내에 대부분 발생하는 것으로 알려져 있기 때문이다. 또한 한 달 이후의 기능회복은 운동 기능 측면에서 매우 미미한 것으로 큰 의미를 가지기 힘들기 때문이다.

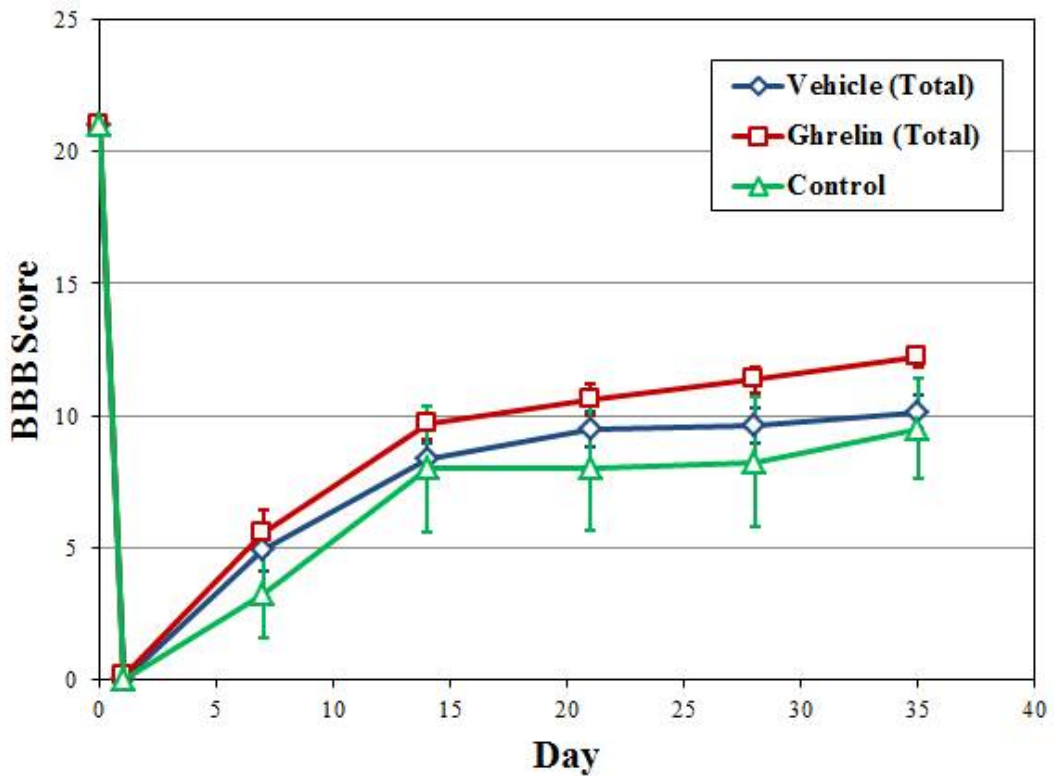


그림 7. 스캐폴드 이식 실험의 기능회복 검사를 위한 BBB 테스트 결과 그래프

BBB 테스트 결과 ghrelin이 함유된 샘플을 이식한 쥐의 경우 5주에 걸쳐 꾸준히 높은 운동 기능 회복을 보여 5주차에는 평균 12.2점에 도달하였다. 또한 대부분의 쥐들이 고르게 운동 기능이 회복되어 편차가 비교적 작았다. 반면 ghrelin이 함유되지 않은 vehicle 샘플의 경우 3주 후부터 기능 회복이 매우 더디어 졌으며, 10점에서 포화(saturation)되었다. 척수의 제거 후 아무것도 이식하지 않은 control 샘플의 경우 샘플간의 운동 기능 회복 수준의 격차가 극심하였으며, 5주가 되어서도 10점을 넘지 못

하는 결과를 보여주었다.

## 2.4. 기능 회복의 의미

BBB 테스트를 통해 얻은 결과를 종합해 보면 다음과 같은 결론을 얻을 수 있다. Control 샘플과 vehicle 샘플의 차이는 agarose 스키펠드의 이식 여부인데, 두 샘플 간의 기능 회복에 있어 가장 큰 차이점은 기능 회복의 편차가 크게 감소하였다는 점이다. 특히 control 샘플은 점수가 vehicle 샘플과 비슷함에도 그 점수가 크게 들쭉날쭉하여 기능 회복 편차가 매우 컸으며 회복 또한 일관성이 없어 경우에 따라 도리어 운동 기능이 감퇴되는 경우도 발생하였다. 따라서 스키펠드는 척수 손상 시의 기능 회복이 안정적으로 일어날 수 있도록 도와주는 역할을 함을 알 수 있으며, 회복 기간에 걸쳐 고르게 신경이 재생되도록 유도함을 확인할 수 있다.

Ghrelin 샘플과 Vehicle 샘플의 결과를 비교해 보면 스키펠드에 함유시킨 ghrelin이 기능회복에 큰 역할을 하였음을 결론적으로 확인할 수 있다. 두 샘플 간의 점수 차이는 비록 2점이지만 그 구간이 앞에서 언급한 바와 같이 유의미한 기능회복을 의미하기 때문이다. 이는 BBB 테스트의 점수 평가 지표와 관련이 있는데, 그림 8을 보면 10점은 겨우 뒷발을 이용하여 무게만을 지탱하는 수준이다 반면 11점을 넘어가면 이동시에 더 이상 뒷발을 끌지 않으며, 점차 점수가 13점에 가깝게 높아짐에 따라 앞발과 뒷발을 조화롭게 움직일 수 있게 된다. 이는 대단히 크고 의미있는 기능회복 상의 차이이다.



- D. MICHELE BASSO, MICHAEL S. BEATTIE, AND JACQUELINE C. BRESNAHAN, "Graded Histological and Locomotor Outcomes after Spinal Cord Contusion Using the NYU Weight-Drop Device versus Transection", EXPERIMENTAL NEUROLOGY 139, 244–256 (1996)

Basso, Beattie, and Bresnahan Locomotor Rating Scale

0	No observable hindlimb (HL) movement
1	Slight movement of one or two joints, usually the hip and/or knee
2	Extensive movement of one joint or extensive movement of one joint <i>and</i> slight movement of one other joint
3	Extensive movement of two joints
4	Slight movement of all three joints of the HL
5	Slight movement of two joints <i>and</i> extensive movement of the third
6	Extensive movement of two joints <i>and</i> slight movement of the third
7	Extensive movement of all three joints of the HL
8	Sweeping with no weight support or plantar placement of the paw with no weight support
9	Plantar placement of the paw with weight support in stance only (i.e., when stationary) or occasional, frequent, or consistent weight-supported dorsal stepping and no plantar stepping
10	Occasional weight-supported plantar steps; no FL–HL coordination
11	Frequent to consistent weight-supported plantar steps <i>and</i> no FL–HL coordination
12	Frequent to consistent weight-supported plantar steps <i>and</i> occasional FL–HL coordination
13	Frequent to consistent weight-supported plantar steps <i>and</i> frequent FL–HL coordination
14	Consistent weight-supported plantar steps, consistent FL–HL coordination, <i>and</i> predominant paw position during locomotion is rotated (internally or externally) when it makes <i>initial contact</i> with the surface as well as just before it is <i>lifted off</i> at the end of stance; or frequent plantar stepping, consistent FL–HL coordination, and occasional dorsal stepping
15	Consistent plantar stepping and consistent FL–HL coordination <i>and</i> no toe clearance or occasional toe clearance during forward limb advancement; predominant paw position is parallel to the body at initial contact
16	Consistent plantar stepping and consistent FL–HL coordination during gait <i>and</i> toe clearance occurs frequently during forward limb advancement; predominant paw position is parallel at initial contact and rotated at lift off
17	Consistent plantar stepping and consistent FL–HL coordination during gait <i>and</i> toe clearance occurs frequently during forward limb advancement; predominant paw position is parallel at initial contact <i>and</i> lift off
18	Consistent plantar stepping and consistent FL–HL coordination during gait <i>and</i> toe clearance occurs consistently during forward limb advancement; predominant paw position is parallel at initial contact and rotated at lift off
19	Consistent plantar stepping and consistent FL–HL coordination during gait, toe clearance occurs consistently during forward limb advancement, predominant paw position is parallel at initial contact <i>and</i> lift off, and tail is down part or all of the time
20	Consistent plantar stepping and consistent coordinated gait, consistent toe clearance, predominant paw position is parallel at initial contact and lift off, <i>and</i> trunk instability; tail consistently up
21	Consistent plantar stepping and coordinated gait, consistent toe clearance, predominant paw position is parallel throughout stance, and consistent trunk stability; tail consistently up

그림 8. BBB 테스트의 평가 지표 [60]

## 2.5. 조직학적 검증

### 2.5.1. 조직 처리 과정

기능 회복 테스트를 마친 쥐는 조직학적 검증을 위하여 조직 처리를 수행하였다. Chloral hydrate 4%로 마취된 쥐는 1xPBS를 이용하여 perfusion하였으며, 4% PFA(paraformaldehyde)를 이용하여 고정하였다. 이후 쥐의 척수 부분을 T9을 중심으로 약 4cm의 길이로 적출한 후 다시 4% PFA에서 5시간 동안 고정하였다. 1X PBS로 충분한 세정 후 30%의 sucrose에서 cryopreservation처리를 하였다.

처리된 조직은 cryostat 장비를 이용하여 20 $\mu$ m 두께로 절단면(cross

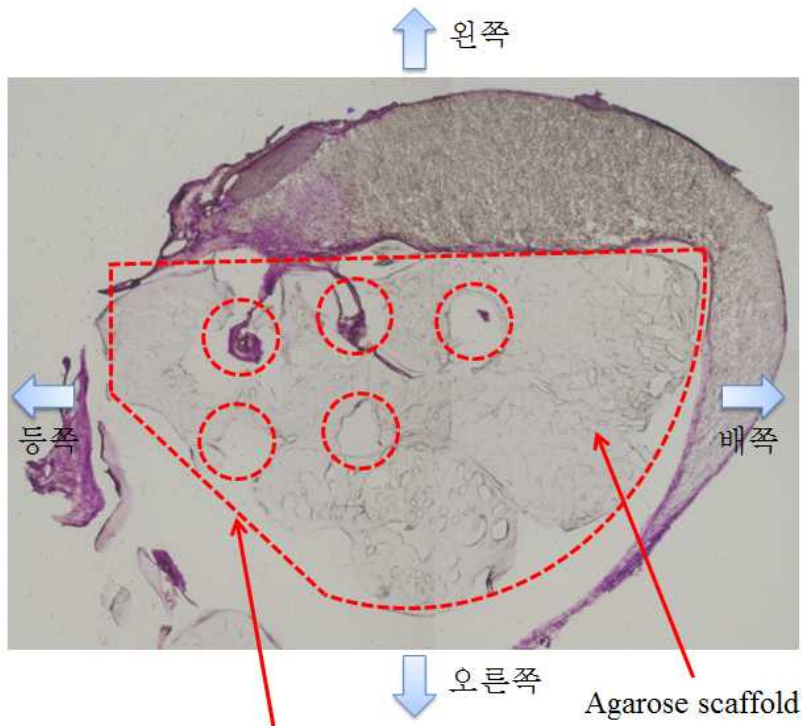




인할 수 있다. 다만 vehicle 샘플의 경우 경우에 종종 스캐폴드와 접촉된 조직 부분이 노랗게 변색되어 있는 모습을 관찰할 수 있었다.

### 2.5.2. 조직 염색 결과

단면 색션된 조직의 cresyl 염색한 결과를 관찰하여, 온전한 형상의 스캐폴드를 확인하였다. 즉, 스캐폴드를 구성하고 있는 agarose가 깨어지거나 용해 없이 최소 1달 이상 장기간 유지됨을 알 수 있었다. 한편 관찰된 염색 사진을 통해 각각의 채널에 신경 세포가 내부로 들어왔음을 관찰할 수 있었다. 그림 10은 스캐폴드가 이식된 척수를 단면으로 자른 후 염색한 사진이다. 6개의 채널을 가지는 반원형의 스캐폴드가 척수에 이식되어 결합되어 있는 모습을 관찰할 수 있으며, 특히 스캐폴드의 채널 내부에서 염색된 신경 조직을 관찰할 수 있다. 이는 ghrelin이 포함된 스캐폴드의 채널 내부로 신경 조직이 재생되어 들어왔음을 의미하는 것이며, 이를 통해 스캐폴드가 신경 세포의 선형적 재생을 도와줌을 확인할 수 있다.



Implant 시 튀어나와서 잘라낸 부분

그림 10. Cresyl staining을 수행한 스캐폴드의 염색 사진

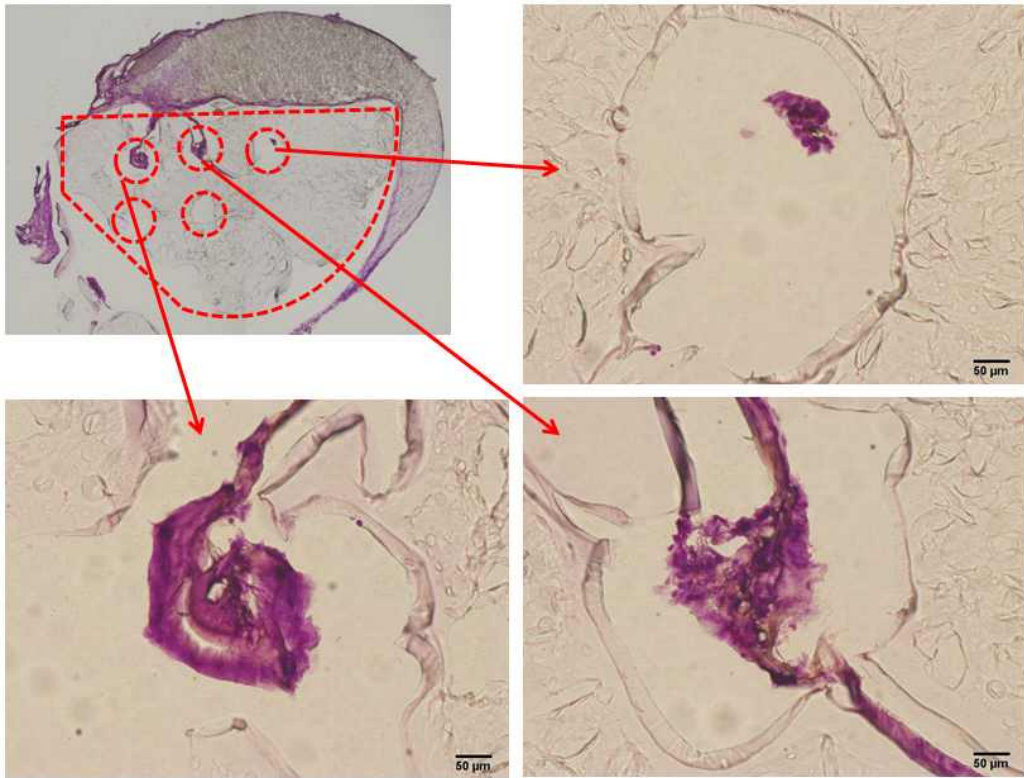


그림 11. 채널 내부의 신경 조직 확대 사진

## 2.6. 스캐폴드 전임상 이식 실험의 결론

척수 신경의 재생을 돕기 위해 아가로즈 재질에 다수의 채널이 포함된 구조를 채택하였다. 또한 채널 내부에 신경 재생을 촉진하기 위하여 ghrelin과 matrigel의 혼합물을 채웠다. 5주간에 걸친 기능회복 테스트 결과 아가로즈 스캐폴드가 이식된 쥐는 스캐폴드가 이식되지 않았을 때에 비하여 기능회복의 편차가 매우 작았다. 또한 약간의 기능회복 또한 확인할 수 있었다. 반면 ghrelin이 포함된 스캐폴드가 이식된 쥐는 기능회복 평가에서 다른 실험군에 비해 통계적으로 유의미한 수준의 기능회복을 보였다.

조직학 분석 결과 아가로즈 스캐폴드는 조직과 잘 결합된 상태에서 온전한 형상을 유지하고 있었다. 또한 채널 내부로 신경세포가 들어와 있음을 관찰하였다. 이와 같은 결과들을 토대로 ghrelin이 함유된 다채널의 아가로즈 스캐폴드는 척수 손상의 기능 회복에 도움이 됨을 종합적으로 결론 내릴 수 있다.

### 3. 척수 손상 평가용 이식형 신경 소자

#### 3.1. 척수 손상 평가 센서의 개념 및 원리

##### 3.1.1. Chondroitin Sulfate Proteoglycan (CSPG)

중추신경계에 존재하며 평상시에 신경 세포를 지지하는 역할을 하는 성상교세포(astrocyte)가 감염(infection) 또는 외상(traumatic injury)에 의해 신경 세포가 손상되면 2차 손상 과정에서 비정상적으로 활성화(activation) 되면서 다양한 비정상적 물질을 분비하게 된다 [1-2]. 이 물질들에 의해 신경 세포를 둘러싸고 있는 환경인 세포외 기질(ECM)이 변화하여 결과적으로 신경교상흔(glial scar)가 형성된다. 신경교상흔이 형성된 곳은 중추신경세포의 축삭(axon)이 재생되지 않는 공간이 되는 특징이 있다. 특히 신경교상흔은 활성화된 성상교세포에 의해 둘러싸여지며, 내부에는 세포의 괴사에 의한 공동(cyst)이 형성되는 외상심부가 발생하게 된다. 신경교상흔 내부에는 당연히 신경이 존재하지 않는다. 이러한 신경교상흔은 대부분이 chondroitin sulfate proteoglycan(CSPG)과 Keratan sulfate proteoglycan(KSPG)으로 구성된다.

CSPG와 KSPG는 신경 축삭의 재생을 방해하는 주 물질로 알려져 있으며, 연구에 의해 신경교상흔의 발생을 나타내는 주요 물질로 밝혀지고 있다 [61-62]. 또한 신경전극 등이 삽입되었을 때 기계적인 요인에 의하여 신경이 손상되는 경우에도 신경교상흔이 발생한다. 이러한 신경교상흔은 신경전극과 신경간의 전기 저항을 높이고, 신경 신호의 획득을 방해하기 때문에 치명적일 수 있다. 따라서 CSPG의 농도를 직접적으로 측

정할 수 있다면 신경교상흔의 발생 추이를 파악할 수 있고, 신경의 손상 정도를 추정할 수 있다.

### 3.1.2. CSPG 센서의 개념

CSPG가 신경교상흔의 주요 구성 물질인 점을 이용하면, CSPG를 직접적으로 측정할 수 있는 이식형 센서의 도출이 가능하다. 즉 손상된 척수에 직접 이식되어 신경 손상에 의해 발생한 신경교상흔의 CSPG 농도를 장기간에 걸쳐 측정한다면, 시간의 추이에 따른 신경 손상의 정도를 정량적으로 파악할 수 있다.

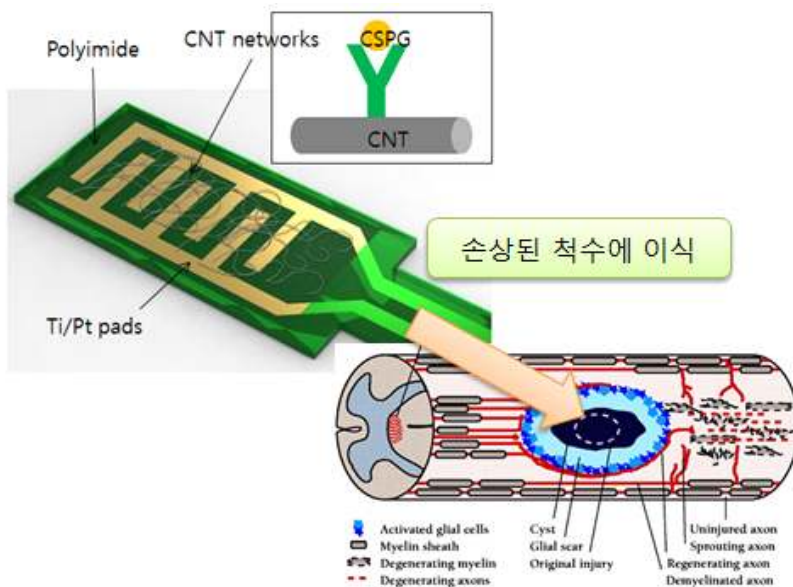


그림 12. 제안하는 CSPG 센서의 개념도

CSPG는 일종의 단백질이므로 장기적 동작이 가능한 단백질 센서의 설계

가 필수적이다. 현재 단백질을 센싱하기 위한 원리로 형광(fluorescence) 방식과 나노와이어(nanowire)를 이용한 방식이 널리 사용되고 있다. 형광 방식은 쉽고 간단하게 in-vitro 상에서 단백질을 확인 가능하나, 시스템의 크기가 큰 단점이 있다. 형광 반응을 일으키기 위해 레이저 광원이 필요하며, 표지 항체를 붙이고 세척하여야 한다. 또한 일회적인 방법이므로 한번 검출하고 나면, 지속적인 검출이 어렵다. 이를 극복하기 위해 검출 과정이 자동화된 LoC(Lab-on-a-chip)이 연구되고 있으나 여전히 외부 광원 소스가 필요하여 체내 환경인 in-vivo 상에서 사용이 어렵다.

반면 나노와이어 방식은 높은 감도를 가지고 있으며, MEMS 공정 등을 이용하여 나노와이어를 반도체 칩에 집적할 수 있기 때문에 소자의 크기를 대폭 줄일 수 있다 [63]. 또한 비표지 방식의 경우, 측정 방식에 따라 별도의 광원이 필요 없는 장점 또한 있다. 하지만 나노와이어를 정렬하여 제작하는 것이 매우 어려운 단점이 가능하다. 또한 측정 범위가 비교적 좁고, 출력 결과값의 보정(calibration)이 까다로우며, 복잡한 신호처리가 요구된다.

이러한 나노와이어 방식의 문제를 극복하기 위하여 최근 그물망(network) 형태의 나노와이어를 이용한 방식의 소자가 연구되고 있다 [64]. 나노와이어 그물망은, 스프레이 또는 담금(dipping) 방식을 이용하여 원하는 위치에 나노와이어가 그물망 형태로 엉켜 있도록 제작한다. 나노와이어 그물망은 단일 나노와이어를 이용하지 않고, 여러 개의 나노와이어가 엉켜있기 때문에, 단일 나노와이어에 비해서 그 성능의 변폭(variation)이 심하지 않은 장점이 있다. 또한 플라즈마 성장과 같이 조건



조절이 까다로운 공정을 사용하지 않고, 이미 만들어진 다량의 나노와이어를 용매에 녹여서 필름 형태로 제작하기 때문에 공정이 매우 간단한 장점이 있다.

### 3.1.3. CSPG 센서의 원리

개념도인 그림 12와 같이 연성 기판 위에 금속 배선을 형성한 후 나노와이어 그물망을 그 위에 형성한다. 그런 뒤 나노와이어 그물망에 CSPG가 부착될 수 있는 항체를 붙여 놓는다. CSPG가 CSPG의 항체와 반응하게 되면, 전하가 발생하여 CNT의 전기 전도도가 변화하게 된다. 이를 외부에서 CNT에 연결된 배선을 통해 측정하게 되면 CSPG의 검출 여부를 파악할 수 있다. 저항 변화 값이 클수록 탐지된 CSPG의 농도가 더 높다.

## 3.2. 나노와이어 특성 평가

### 3.2.1. 나노 와이어의 종류

현재 측정을 위해 사용되는 나노와이어로는 실리콘(silicon) 나노와이어,  $\text{In}_2\text{O}_3$  나노와이어, 카본나노튜브(CNT), ZnO 나노로드, 금 나노와이어 등 나노와이어 등이 있다. 각각의 나노와이어들은 carrier type에 따라 p-type과 n-type으로 구분될 수 있으며, 이에 따라 분석 대상이 탐지되면 저항이 증가하거나 감소한다. 그물망 나노와이어는 저항값이 단일 나노와이어에 비해 평균적인 특성을 가지기 때문에 저항값의 변화를 측정함으로써 신호의 후처리를 용이하게 한다.

다양한 나노와이어 중 그물망 나노와이어로 쉽게 사용이 가능한 것은 CNT와 ZnO 나노로드, 은 나노와이어이다. 나노와이어 선택에 중요한 포인트는 제작의 용이성과 독성 및 임피던스 특성이다. CNT는 -COOH와 같이 작용기가 친수성으로 functionalized 된 경우 쉽게 수용액에 분산 (dispersion) 가능하며, 은 나노와이어도 물에 분산된 형태의 제품이 판매되고 있어 스프레이 등의 방식을 통해 쉽게 그물망 나노와이어의 형성이 가능하다. 하지만 ZnO의 경우 용액상에서 복잡한 과정을 거쳐 성장시켜야 하기 때문에 다소 성장이 어려운 측면이 있다. CSPG 센서는 체내에서 동작하여야 하기 때문에 당연히 독성 수준이 낮아야 한다. CNT와 ZnO 나노로드, 은 나노와이어 따라서 각각의 나노 와이어에 대한 독성 평가가 선행될 필요가 있다.

**표 5.** 나노와이어의 종류 및 저항변화 특성 [63]

나노와이어 종류	Carrier type	분석 대상	저항 변화
Si NW	p-type	Virus	Increase
In <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	n-type	LDL	Decase
CNT	p-type	Protein	Increase
ZnO	n-type	Protein	Increase

### 3.2.2. 나노와이어 그물망의 제작

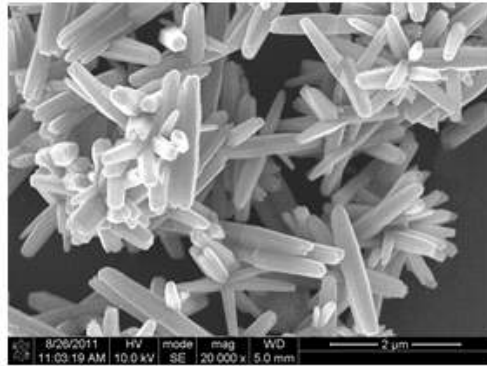
CNT, 은 나노와이어 두 가지 나노와이어에 대하여 나노와이어 그물망 제작을 테스트 하였다. 모든 그물망의 제작은 추후 독성 검사 및 세포

형상 검사를 위해 커버 글래스 위에 제작하였다. 제작한 각 나노와이어 그물망은 전자주사현미경(SEM)을 이용하여 관찰하고, 임피던스 특성을 관찰하였다.

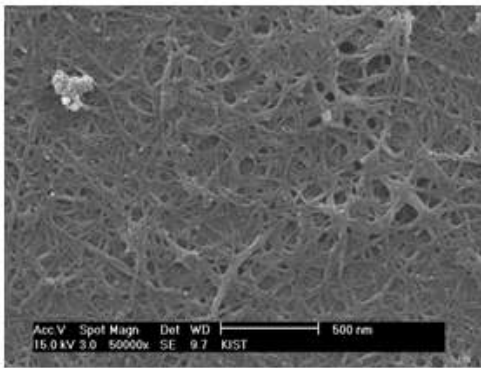
CNT는 COOH로 functionalized된 CNT를 사용하였으며 Nanolab Inc. 사의 제품을 사용하였다. 구입한 CNT의 평균 굵기는  $30\pm 10\text{nm}$ 이며, 길이는  $1\sim 5\mu\text{m}$ 이다. 물에 분산하여 사용하였으며, 농도는  $0.1\text{mg/ml}(0.01\text{wt}\%)$ 를 사용하였다.  $120^\circ\text{C}$ 의 핫 플레이트 위에 유리판을 올려 놓은 상태에서 50ml의 CNT 수용액을 스프레이하여 CNT 나노와이어 그물망을 제작하였다.

실버 나노와이어는 (주)나노픽시스 사의 제품을 구입하여 사용하였으며, 평균 굵기는  $45\pm 10\text{nm}$ , 길이는  $25\pm 5\mu\text{m}$ 이다. 물에 분산된 용액을 사용하였으며 농도는  $0.1\text{mg/ml}(0.01\text{wt}\%)$ 이고 100ml의 용액을 CNT와 동일 방법인 스프레이 분사 방법으로 나노와이어 그물망을 제작하였다.

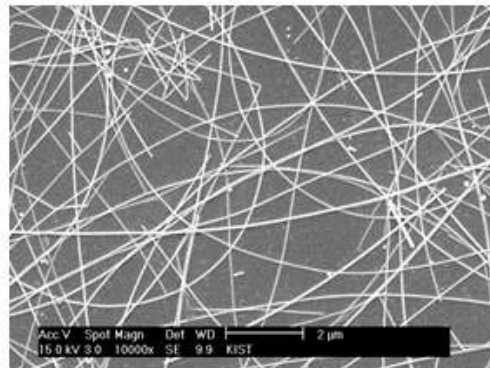
ZnO 나노로드는 다소 복잡한 방법을 이용하여 제작하였다. 우선 Zinc acetate와 2-Methoxyethanol, ethanolamin을 섞은 후 샘플을 용액 내에 넣어 ZnO 박막을 코팅하였다. 이 샘플을 Zinc nitrate와 Hexamethylenetetramine과 distilled water가 섞여 있는 용액에 넣은 후  $80\sim 150^\circ\text{C}$ 의 온도를 가하여 최종적으로 나노로드를 성장시켰다.



(a) ZnO nanorod



(b) CNT



(c) Silver nanowire

그림 13. Cover glass 위에 성장시킨 그물망 나노와이어의 SEM 형상

### 3.2.3. 나노와이어 임피던스 특성 평가

물질의 전기화학적 임피던스 특성은 신경 전극으로써의 성능을 가늠할 수 있는 중요한 척도이다. 일반적으로  $1\text{M}\Omega$ 이 넘으면 전극으로써의 성능이 크게 떨어지는 것으로 평가되며, 수백 $\text{k}\Omega$  이하 수준이어야지만 성능을 보장할 수 있다. Potentiostats (AMETEK-Princeton Applied Research, VersaSTAT) 장비를 이용하여 측정하였으며, 측정 셋업은 일반적인 삼전극법을 사용하였다. 측정범위는 1Hz부터 10kHz까지 측정하였으며, 신경 신호의 범위가 1kHz 내외이므로 1kHz에서의 임피던스를 주요 척도로 삼았다.

아래의 그래프는 각 나노와이어에 대한 임피던스 특성을 측정한 그래프이다. ZnO 나노로드의 경우 140Hz 미만에서는 원활한 임피던스의 측정이 불가하였으며,  $135\text{M}\Omega$ (at 1kHz)에 달하여 사실상으로 전극으로 사용 불가능한 수준이었다. CNT의 경우  $20.6\text{k}\Omega$ (at 1kHz)의 임피던스가 측정되어 전극으로 상당히 괜찮은 수준을 보여 주었다. 은 나노와이어는 세 가지 나노와이어 중 가장 낮은  $924\Omega$ 이 측정되었다.

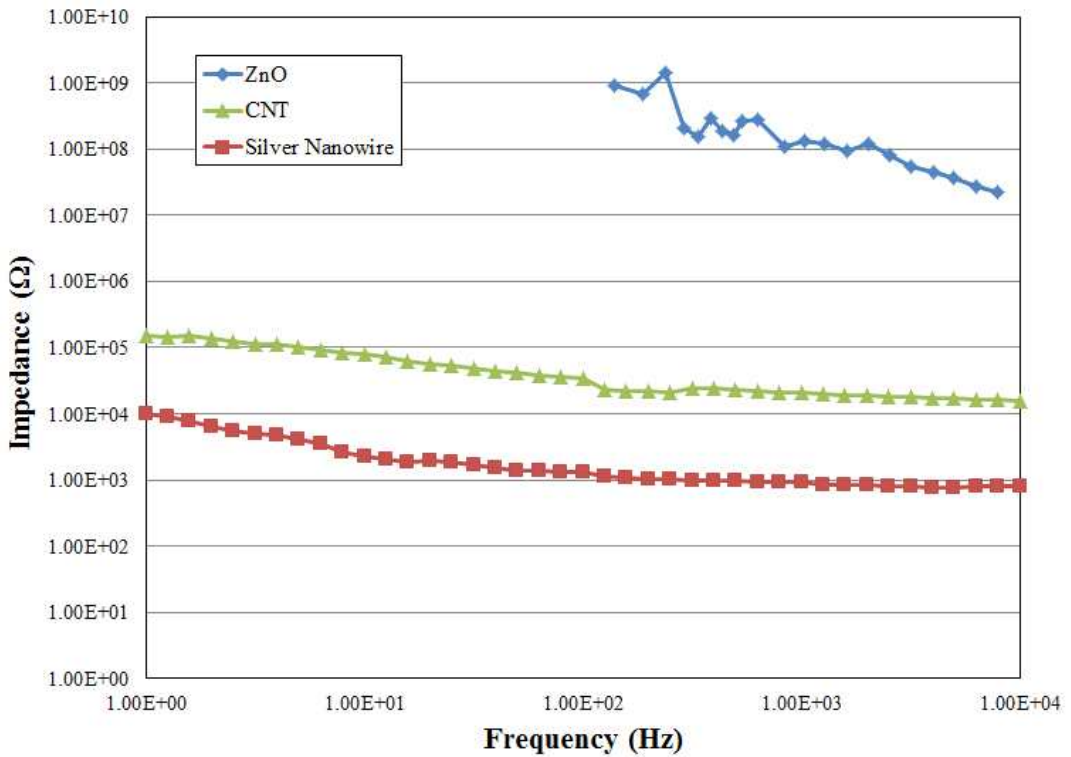


그림 14. 나노와이어의 임피던스 특성 측정 결과 그래프

### 3.2.4. 나노와이어 독성 평가

나노와이어의 세포에 대한 독성 평가를 실시하였다. 신경교상흔의 외곽을 둘러싸고 있는 성상교세포(astrocyte)는 신경교상흔의 주요 물질인 CSPG를 분비한다. 따라서 성상교세포에 대한 독성 반응이 있는 경우 원하지 않는 CSPG 농도가 측정될 가능성이 높다. 따라서 성상교세포에 대한 독성 평가를 실시하였다.

독성 평가 프로토콜은 MTS 에세이를 이용한 방법을 사용하였다. MTS 에세이는 Promega 사의 키트를 사용하였으며, 기본적인 원리는 일반적으

로 널리쓰이는 MTT와 유사하다. MTS tetrazolium이 살아 있는 세포와 반응할 경우 formazan을 형성하며, 형성된 formazan의 양을 450~490nm 대역의 레이저의 흡수율로 비교 분석하여 세포의 독성을 평가하는 방식이다.

70% EtOH에 담긴 샘플을 UV에서 1시간동안 멸균처리한 다음 웰 플레이트에서 건조하였다. 건조한 샘플은 세포의 부착을 위해 PDL 코팅을 오버나이트 처리하였다. 건조한 샘플 위에  $5 \times 10^4$ 개의 정상교세포를 seeding 하고, 3일간(72hrs) CO<sub>2</sub> 인큐베이터에서 세포를 incubation한 후 배지용액인 DMEM을 suction하였다. PBS로 세정한 세포에 MTS 용액을 넣은 후 3시간 incubation하여 반응을 일으키고, 갈색으로 formazan이 형성되었음을 확인한 후 450nm 파장으로 흡수율을 측정하였다.

측정 결과 ZnO 나노로드가 가장 나쁜 독성 결과를 보여주었고, CNT는 거의 독성이 나타나지 않을만큼 좋은 독성 결과를 보여주었다.

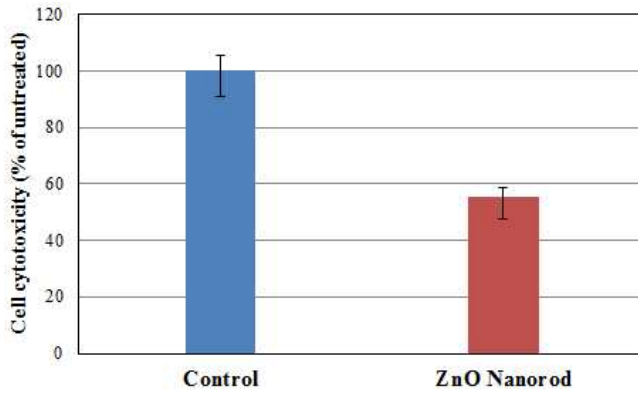


그림 15. ZnO 나노로드의 독성 평가 결과

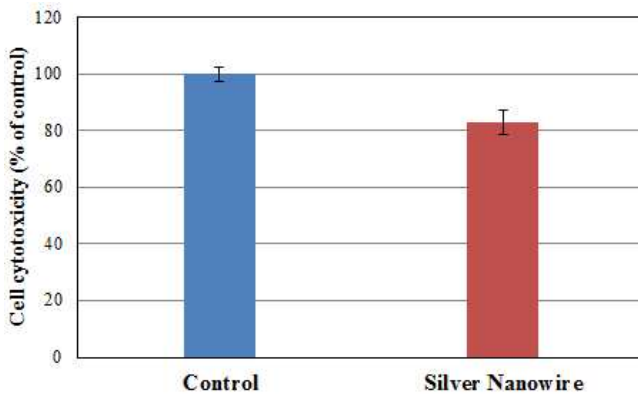


그림 16. 은 나노와이어의 독성 평가 결과

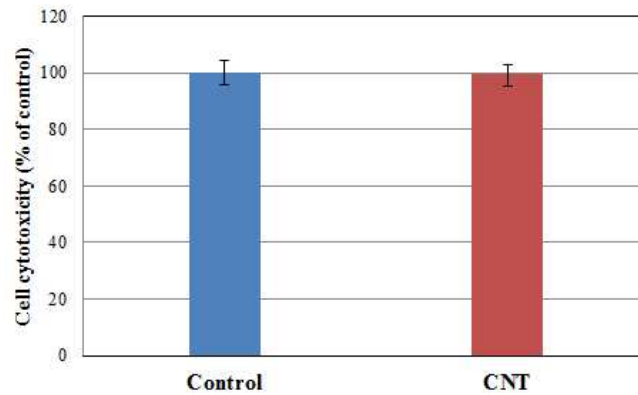


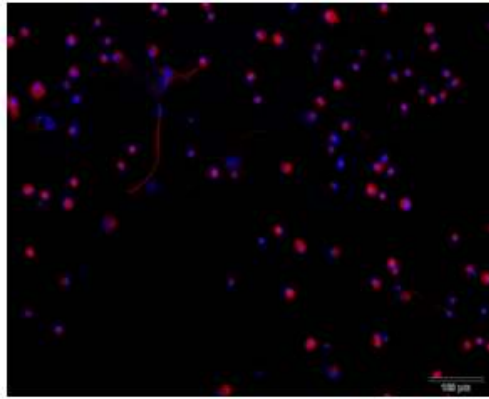
그림 17. CNT의 독성 평가 결과



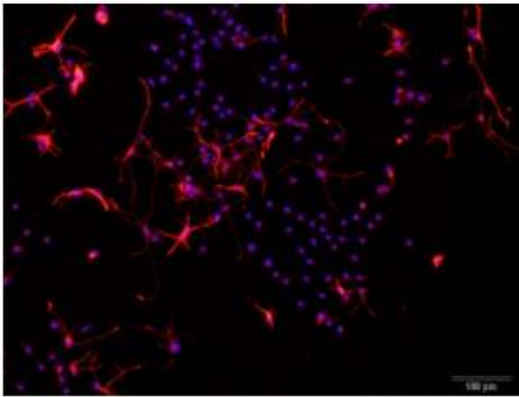
### 3.2.5. 나노와이어 세포 형상 평가

센서에 사용될 나노와이어는 단일 나노와이어 형상이 아닌 그물망 형태이므로 나노와이어가 스프레이된 표면에서의 세포 형상 또한 중요한 평가요소가 될 수 있다. 각각의 나노와이어에 대하여 임피던스 및 독성 검사와 동일한 방법으로 커버 글래스 에 제작된 나노와이어 그물망 위에 성상교세포를 걸쳐한 뒤 그 형상을 면역형광법을 이용하여 형광현미경(confocal microscope)으로 관찰하였다.

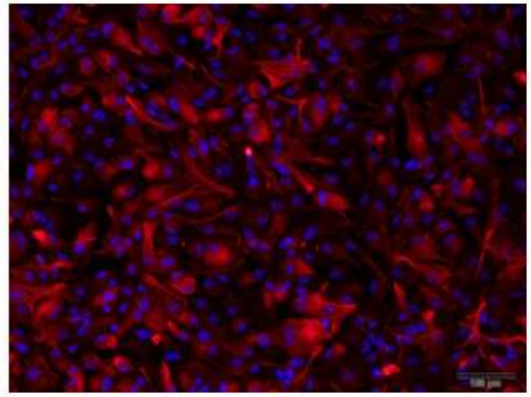
성상교세포의 형광염색을 위해 GFAP와 DAPI를 사용하여 염색하였다. 결과 ZnO는 성상교세포의 형상이 매우 좋지 못하였다. 성상교세포 특유의 별모양이 거의 나타나지 않았으며, 증식(proliferation)도 거의 일어나지 않았음을 관찰할 수 있었다. 은 나노와이어의 경우 군데군데 성상 형상이 관찰되었으나, 밀도가 비교적 낮았다. CNT의 경우 증식이 정상적으로 일어났으며 형상도 잘 관찰되었다. 따라서 독성 검사 결과와 유사하게 CNT가 가장 좋은 독성 특성을 보였다.



(a) ZnO nanorod



(b) Silver nanowire



(c) CNT

그림 18. 나노와이어의 형광 염색 결과

### 3.2.6. 나노와이어 특성 실험 결론

임피던스, 세포 독성 검사, 세포 형상 관찰을 종합하여 볼 때 나노와이어 중 CNT가 가장 in-vivo 환경에서 사용하기 좋은 나노와이어로 결론을 내렸다. 은 나노와이어의 경우 CNT에 비해 임피던스가 좋으나 CNT가 가지는  $20.6\text{k}\Omega$ (at 1kHz) 값이 전혀 나쁘지 않은 좋은 값이기 때문에 CNT가 최적으로 결론을 내렸다. 따라서 CSPG 센서의 나노와이어로 CNT를 사용하였다.

## 3.3. CSPG 센서의 제작

### 3.3.1. CSPG 센서의 연성 기판 선택 및 공정 조건

CSPG 센서는 생체 이식형이므로 조직에 대한 기계적 손상을 최소화하기 위해서는 연성 재료의 기판이 유리하다. 생체 적합성 물질 중 PDMS(polydimethylsiloxane)과 polyimide, SU-8 등이 생체 적합성 연성 기판 물질로 주로 사용되며, 각각의 장단점이 있다. PDMS는 다양한 형상으로 casting 기법을 이용하여 몰딩제작이 가능하나, 그 특성상 얇게 만들거나 표면에 금속을 패터닝하는 공정이 대단히 어렵다. polyimide 역시 금속의 접착성이 PDMS와 비슷하게 나쁘나, 스핀 코팅(spin coating) 공정을 통해 수~수십  $\mu\text{m}$  두께의 박막이 형성 가능하며, MEMS 공정을 이용한 wafer process가 가능하다. SU-8은 본래 PR로 사용되나, 두께와 bake 조건을 조절하면 연성 기판으로 사용할 수 있다. 하지만 스트레스가 심하고 PDMS, polyimide와는 달리 취성이 있어 기판 재료로 다소 부적합하

다. 따라서 CSPG 센서의 연성 기판 물질로 polyimide를 선택하였다.

Polyimide는 VTEC PI-1388(R. Blaine Industries, PA USA)를 사용하였다. 이 제품은 안정성이 매우 우수하며, 열팽창 계수(CTE, coefficient of thermal expansion)이 38ppm/K로 PDMS (310ppm/K) 등에 비해 매우 낮아 배선 재질로 사용된 백금(Pt, 9ppm/K)와의 차이가 비교적 작다. 따라서 경화 열처리(curing) 시에 적은 열 스트레스를 기대할 수 있다.

캐리어 기판으로는 4인치 실리콘 웨이퍼를 사용하였다. 먼저 실리콘 웨이퍼를 황산:과수=4:1, 120°C 용액에서 SPM 클리닝을 수행한 후 polyimide를 스핀 코팅하였다. HMDS 처리는 하지 않았으며, 500rpm에서 10초 1000rpm에서 30초 조건을 이용하여 코팅하였다. 코팅한 polyimide는 컨벡션 오븐에서 분당 4°C씩 온도를 50분에 걸쳐 200°C로 상승시킨 후 200°C에서 1시간 curing을 실시하였다. 이후 2시간에 걸쳐 상온으로 서서히 온도를 냉각시켰다. 온도를 급격히 가열시키거나 냉각시키는 경우 polyimide 표면에 물결과 같은 무늬가 관찰되었으며, 금속 배선이 있는 경우 crack이 발생하는 문제점이 발생하므로 주의하여야 한다.

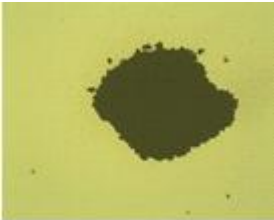
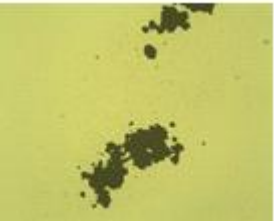
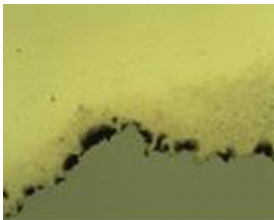

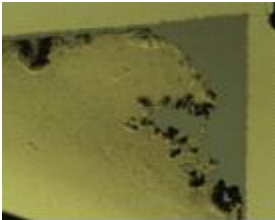

### 3.3.2. Polyimide의 금속 배선을 위한 접착력 향상

Polyimide의 curing 후 polyimide와 금속 배선간의 접착력을 향상시키기 위하여 표면을 플라즈마 처리 하였다. 기존의 연구 결과를 보면 polyimide는 화학적으로 작용기가 없어 금속과의 화학적 결합이 어렵다. 따라서 표면의 거칠기를 높임으로써 금속 박막과 polyimide 간의 접착력을 향상시키는 시도가 주로 이루어져 왔다. 거칠기를 향상시키는 방법으

로는 고온의 KOH에서 식각을 하는 방법, 플라즈마 처리를 하는 방법 등이 시도 되었으며, 일반적으로 플라즈마 처리를 사용한다. Polyimide와 금속 박막간의 접착력 향상을 위해 O<sub>2</sub> 플라즈마를 이용한 접착력 테스트를 실험하였다.

접착력을 확인하기 위하여 polyimide가 코팅된 기판을 각 조건에 맞게 플라즈마 처리를 한 후, Al 3000Å을 증착하였다. 금속이 증착된 기판은 ultrasonic에서 1시간 세정을 실시하였으며, 꺼내어서 금속 박막 표면의 형상 변화를 관찰하였다. 관찰 결과를 보면, 플라즈마 처리를 하지 않은 경우 polyimide 표면의 대부분의 알루미늄 박막이 뜯겨 나가는 현상이 관찰되었다. 반면 O<sub>2</sub>/CF<sub>4</sub> 가스를 이용한 경우나 O<sub>2</sub> 가스를 이용하여 1분간 처리를 한 경우 웨이어의 가장자리 부분에서 박막이 일부 뜯겨져 나감이 확인되었다. 그러나 그 정도가 O<sub>2</sub> 가스만을 이용한 경우에 비해 O<sub>2</sub>/CF<sub>4</sub> 가스를 이용한 경우가 미세하게 좋았다. 따라서 polyimide 기판위의 금속 접착 향상을 위하여 O<sub>2</sub>/CF<sub>4</sub> 가스를 사용하였다.

표 6. Polyimide의 금속 박막 접착력 향상을 위한 플라즈마 처리 조건 및 결과

플라즈마 처리 없음	처리 조건 1	처리 조건 2
-	Oxford RIE etcher Gas: O <sub>2</sub> 100sccm CF <sub>4</sub> 5sccm Pressure: 0.1Torr Power: 150W Time 1min	Oxford RIE etcher Gas: O <sub>2</sub> 100sccm Pressure: 0.1Torr Power: 150W time 1min
Ultrasonic 1hr	Ultrasonic 1hr	Ultrasonic 1hr
 	 	 

### 3.3.3. Polyimide 식각 조건

Polyimide의 식각은 Al 박막을 마스크로 사용하였으며, RIE 장비를 이용하여 식각을 수행하였다. Al 박막은 양성 감광막인 AZ1512 및 습식 식각액인 Al-12S(Cyantek)를 이용하여 패터닝하였다. 에칭 조건은 O<sub>2</sub> 100sccm, CF<sub>4</sub> 5sccm, 압력 0.1Torr, RF power 150W로 금속 박막의 접착

력 향상을 위한 플라즈마 처리 조건과 동일하게 잡았다. 식각률의 확인 결과 약 분당  $0.4\mu\text{m}$ 의 식각률을 보였으며, Al mask  $3000\text{\AA}$  당 polyimide  $15\mu\text{m}$ 를 안정적으로 식각할 수 있었다.

#### 3.3.4. CSPG 센서의 제작 공정

CSPG 센서의 제작 공정은 다음과 같다. 우선 전술한 바와 같이 실리콘 캐리어 웨이퍼에  $10\mu\text{m}$  두께의 polyimide를 코팅한 후 curing 하였다. 금속 박막과의 접착력 향상을 위해  $\text{O}_2/\text{CF}_4$  가스를 이용하여 플라즈마 처리를 한 후 Pt 금속 배선의 lift-off 공정을 위하여 음성 감광막인 DNR-L300(Dongjin Semichem, Korea)을 패터닝하였다. 금속 배선으로  $300\text{\AA}$ 의 Ti를 접착층으로 하여  $3000\text{\AA}$ 의 Pt를 증착하여 lift-off 공정을 수행하였다. 이 때 Al  $3000\text{\AA}$ 을 같이 증착하여 나중의 식각 공정 시에 self-align이 된 상태에서 한 번에 식각 공정을 수행할 수 있도록 하였다. 이후 다시  $5\mu\text{m}$  두께의 polyimide를 코팅하여 curing을 실시 하여 passivation을 하였다. 이어  $6000\text{\AA}$ 의 Al을 증착하여 식각 마스크를 패터닝한 후, 플라즈마 장비를 이용하여 식각함으로써 소자의 형상을 형성하였다. Al 마스크층을 Al 식각액을 이용하여 식각한 후 최종적으로 CNT 그물망을 스프레이 방법을 이용하여 형성하여 센서를 제작하였다. CNT 그물 망에는 CSPG 항체를 부착하였다.

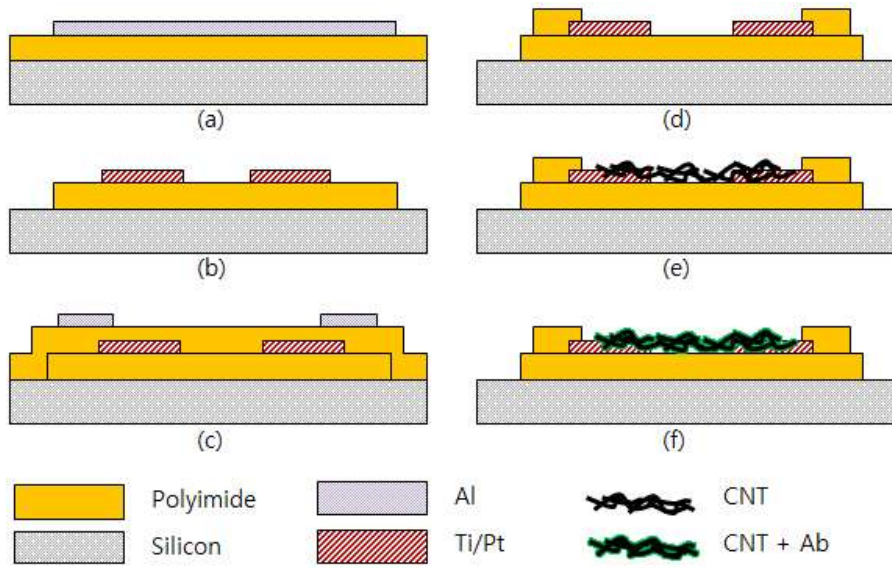


그림 19. CSPG 센서의 제작 공정 흐름도

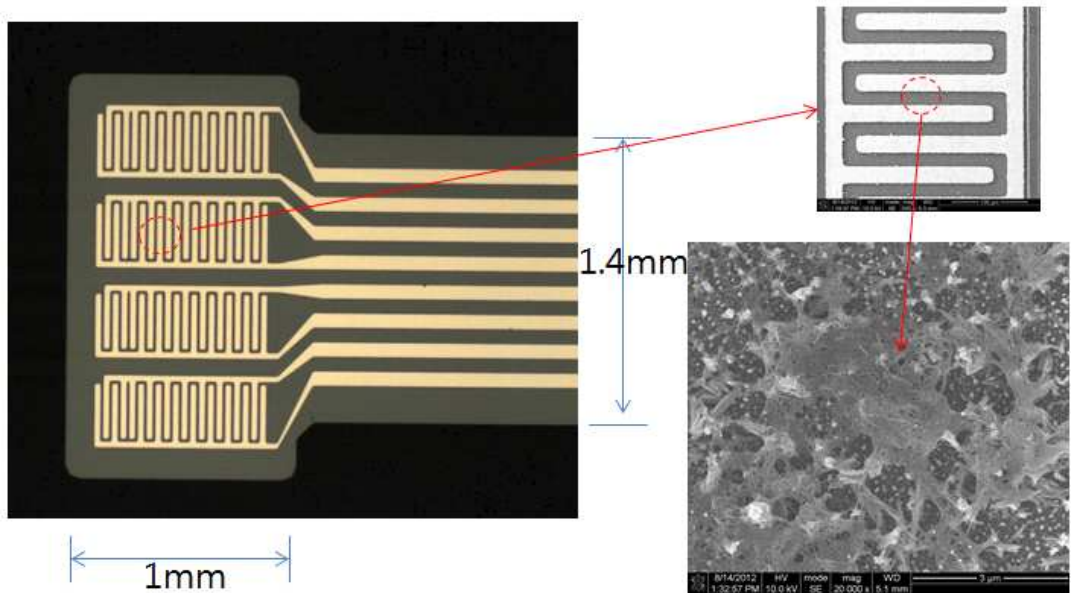


그림 20. 제작한 CSPG 센서의 형상



### 3.4. CSPG 센서 측정

CSPG 센서의 in-vitro 측정을 위하여 CSPG 추출 시료인 Chicken Extracellular Chondroitin Sulfate Proteoglycan(Merk Millipore, Germany)를 사용하였다. 센서는 70% EtOH에서 UV를 조사하여 1시간 동안 멸균 처리를 하였다. 0.2wt SDS가 포함된 1XPBS로 10분간 세정을 수행한 후 CSPG의 한 종류인 NG2의 항체인 ab anti-NG2 Chondroitin Sulfate Proteoglycan(Merk Millipore, Germany)를 부착하였다. 1:500의 ab anti-NG2를 10분간 부착하였으며, 0.2wt% SDS 1XPBS로 10분간 세정하였다.

CSPG는 해동을 하여 50:1, 100:1, 200:1, 500:1, 1000:1로 1mg/ml 농도의 시료를 희석하여 준비하였다. 각각의 희석된 농도의 용액을 센서에 적용한 후 초기 저항값에 대한 저항값의 변화를 측정하였다. 그림 21은 측정 결과 그래프이며, CSPG의 농도에 따라 제곱근 경향의 저항값 변화가 관찰되었다. 또한 1 $\mu$ g/ml의 CSPG를 측정할 수 있음을 확인하였다. CSPG는 10 $\mu$ g/ml이 넘는 농도에서 신경의 재생을 방해하는 효과가 있는 것으로 알려져 있다. 따라서 센서는 신경 재생이 억제되는 CSPG의 농도 수준을 신경교상흔으로부터 확인할 수 있다.

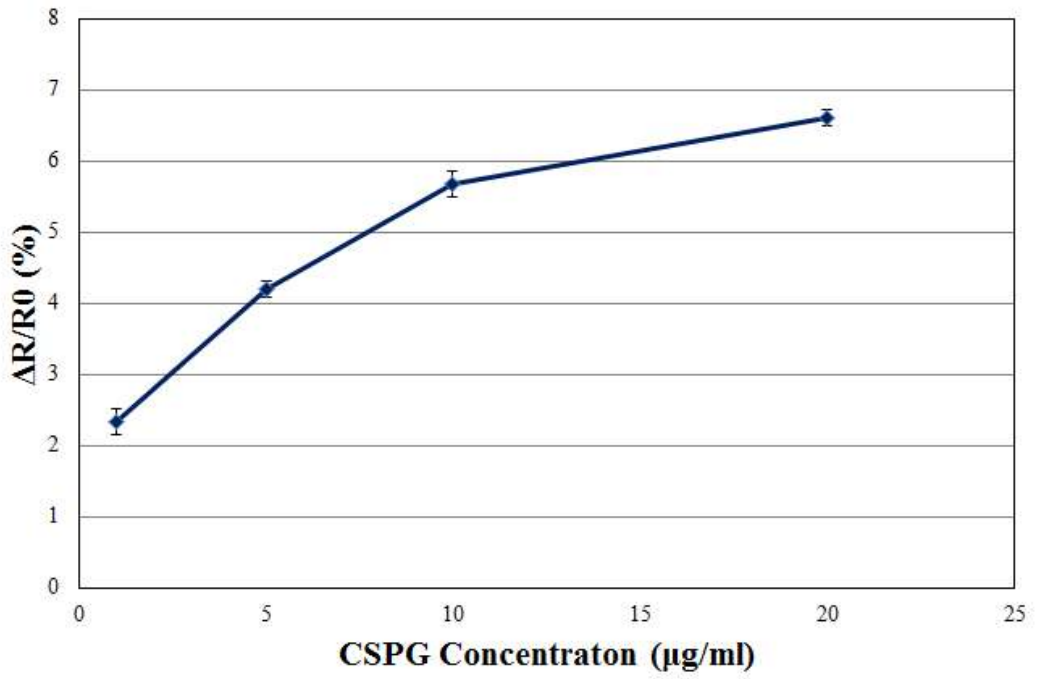


그림 21. CSPG에 대한 센서의 저항값 변화 측정 그래프

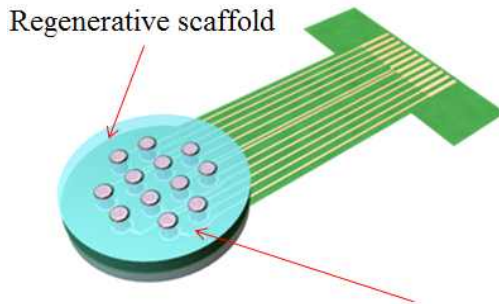
## 4. 척수신경 신호 측정용 이식형 신경 소자

### 4.1. 신호 측정용 신경 소자의 설계

#### 4.1.1. 신호 측정용 신경 소자의 개념 및 신호 측정 원리

제안하는 신경소자는 손상된 신경 조직 부위에 이식되어 신경을 재생 시킴과 동시에 재생된 신경으로부터 신경신호를 획득하고자하는 것을 목적으로 한다. 따라서 기존의 신경 신호 측정용 소자와는 달리 이식되는 신경 조직 부위의 손상을 재생시키기 위한 별도의 약물 전달체와 일체화되어 있는 구조를 가진다. 손상을 재생시키기 위한 약물 전달체는 또한 소프트한 재질의 수화젤로 구성되어, 신경조직과의 기계적 강도 차이로 인한 이차적인 신경조직의 손상을 억제하는 효과를 가질 수 있다.

제안하는 신경소자는 신경 조직의 재생을 돕기 위한 스캐폴드와 신경 신호를 읽기 위한 시브형태의 전극이 하나로 일체화되어 있는 형태를 가지고 있다. 신경 조직의 재생을 돕기 위한 약물 전달체인 스캐폴드에는 선형적인 신경의 재생을 돕기 위한 300 $\mu$ m 지름의 원형 도관이 형성되어 있으며, 내부에는 신경 재생을 돕기 위한 10nM의 ghrelin이 matrigel과 혼합되어 채워져 있다. 이 도관은 시브형태 신경 전극의 원형 링 전극 부위에 정렬되어 있도록 제작한다. 도관을 통해 신경 조직이 재생되어 자라 들어오게 되면 최종적으로 전극 부위와 닿게 되고, 전극에 닿은 신경 세포의 전기신호를 읽어서 외부에서 측정하게 된다.



Sieve electrodes on MEMS flexible device

그림 22. 제안하는 척수신경 신호 측정용 이식형 신경 소자의 구조도

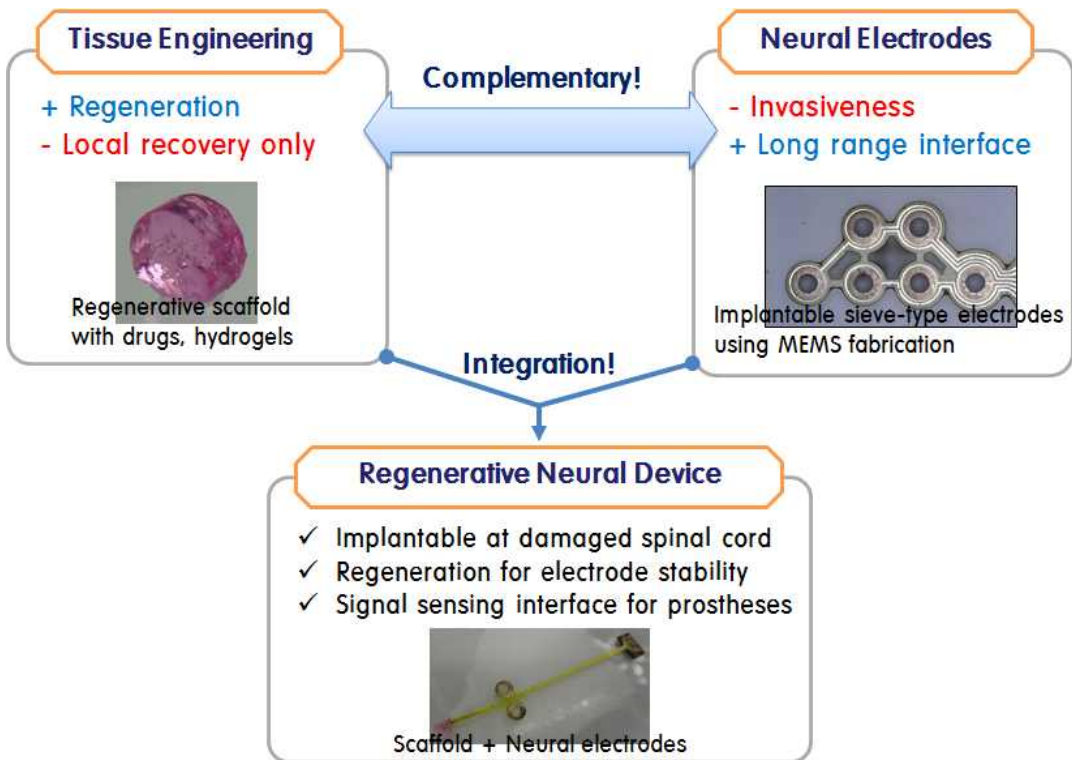


그림 23. 도식화 한 제안된 신경 소자의 특징

신경 신호를 획득하기 위한 시브형태 신경 전극은 polyimide를 사용하여 별도로 제작되는데, 재생을 위한 스캐폴드와 일체화 된 형태로 정렬

하여 제작하는 것이 대단히 중요하다. 정확하게 정렬되면서도, 스캐폴드의 기계적 강도를 유지함으로써 정렬이 틀어지거나, 스캐폴드가 깨어지는 현상을 억제하여야 한다.

#### 4.1.2. 시브형태 신경 전극의 설계

시브형태의 원형 전극은 이식을 적용하고자 하는 쥐의 hemisection lesion model에 맞게 반쪽 형태로 제작하였다. 원형 시브 전극은 스캐폴드와 정렬을 통한 일체화가 가능하도록 200 $\mu\text{m}$  지름의 관통 홀이 600 $\mu\text{m}$ 의 피치를 가지도록 배열하였으며, 배선을 쥐의 체외로 빼내어 인터페이스 보드에 연결할 수 있도록 2.4cm의 길이를 빼 내어 배열하였다. 전극에는 척수 내부에서 고정을 할 수 있도록 3.6mm 지름의 고정용 링이 있어서, 외부의 힘에 의해 척수 내부에 이식된 소자가 흔들리는 것을 방지하도록 했다. 또한 고정용 링에는 기준전극(reference electrode/ counter electrode)을 형성해 놓았다. 전극 연결선의 폭은 1mm로 설계하였으며, polyimide 시브 전극의 두께는 30 $\mu\text{m}$ 로 설계하여 충분한 기계적 강도를 유지하도록 하였다. 전극의 물질은 백금을 사용하였으며 두께는 3000 $\text{\AA}$ 으로 설계하였다.

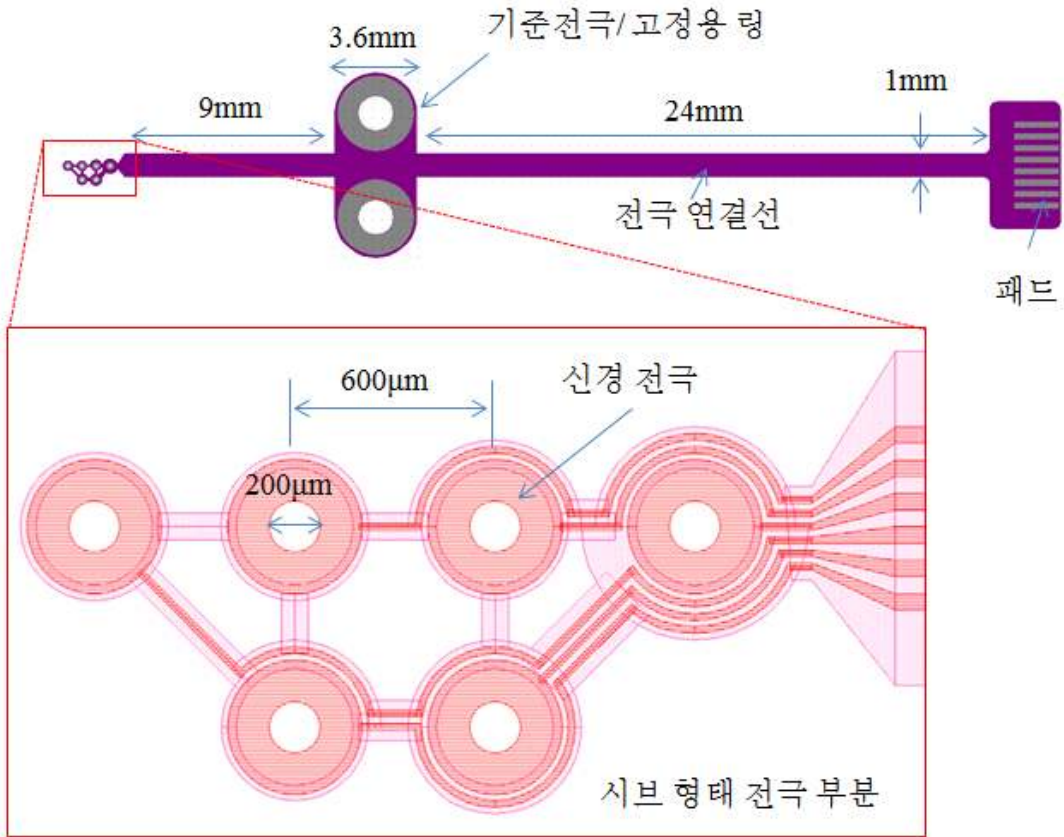


그림 24. 시브형태 신경 전극의 구조

#### 4.1.3. 시브형태 신경 전극의 공정 설계

시브형태 신경 전극의 재질 및 구조, 공정 방법은 이식형 CSPG 센서와 동일하게 하였다. 실리콘 기판을 캐리어 웨이퍼로 사용하였으며 15µm의 polyimide를 코팅한 후, lift-off 공정을 이용하여 전극 및 금속 배선을 형성하였다. 이어서 passivation을 위한 15µm의 polyimide를 위에 도포한 후 polyimide 식각을 위한 Al 마스크를 패터닝 하였다. 최종적으로 플라즈마 RIE 장비를 이용하여 polyimide를 식각한 후 release를 수행하도록

설계하였다.

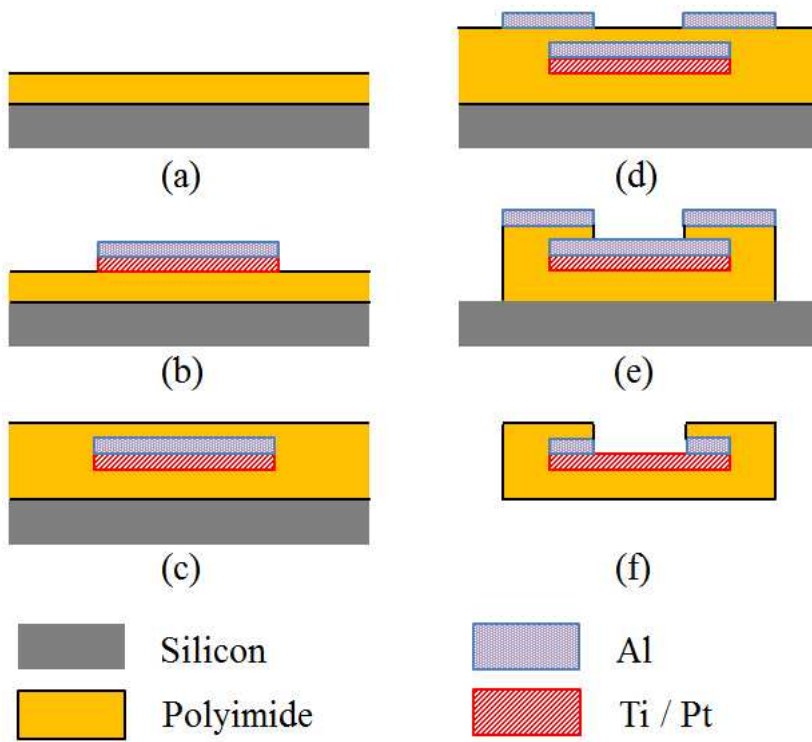


그림 25. 신경 전극의 MEMS 제작 공정 흐름도

## 4.2. 스캐폴드와 시브형태 신경 전극의 일체화

신경 재생용 스캐폴드와 시브형태 신경전극의 일체화에서 가장 중요한 요소는 스캐폴드에 형성될 신경 재생 도관과 신경전극의 링형태 전극이 정확하게 일치되도록 제작하는 것이다. 스캐폴드의 재질인 아가로즈는 고온에서 용융된 아가로즈 용액이 식으면서 형상이 만들어지 때문에 주형(cast molding) 방식으로 형태를 만드는 것이 가장 쉽다. 하지만 신경전극은 polyimide의 고형 재질이기에 때문에, 주형 방식으로 제작하는 스캐폴드와 배치 process를 이용한 제작이 어렵다. 따라서 신경전극을 제작한 후에 이를 바탕으로 스캐폴드를 주형(cast molding) 방식으로 덧 씌워 신경 전극을 감싸는 형태로 제작하는 방식을 선택하였다.

제작한 일체화용 몰드의 형상은 우선 반원 모양의 신경전극과 일체화될 수 있도록 설계되었다. 상하판과 정렬용 틀로 구성된 4개의 부품과 반원의 나머지 반쪽 부분을 끼워서 조립할 수 있도록 캡 부품으로 구성된다. 상하판의 캡에는 스캐폴드의 도관을 형성하는 300 $\mu\text{m}$  외경의 파이프가 삽입될 수 있도록 홀이 형성되어 있으며, 파이프 내부에는 150 $\mu\text{m}$ 의 텅스텐 핀이 삽입될 수 있도록 하였다. 이 텅스텐 핀은 polyimide 신경 전극에 형성되어 있는 홀을 관통하여 연결되도록 조립을 한다. 이렇게 되면 도관 형성용 파이프와 신경 전극의 시브 전극이 50 $\mu\text{m}$ 의 오차범위 내에서 기계적으로 정렬된다. 조립한 몰드는 최종적으로 용융한 아가로즈에 넣고 캡 부품을 조립하여 반원 모양의 스캐폴드가 전극과 일체화된다.



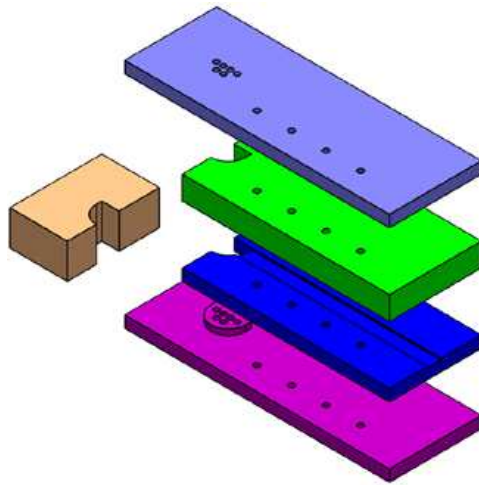


그림 26. 일체화 몰드의 형상

일체화 몰드 틀을 이용하여 아가로즈 스캐폴드의 도판과 시브전극의 신경전극 부위가 잘 일체화되도록 제작할 수 있었다. 하지만 이 과정에서 몇 가지 문제점이 발견되었다. 첫째 상판과 하판으로 구성된 4개의 부품이 때로는 정확하게 기계적으로 정렬되지 않는 경우가 발생하였다. 둘째, 금속 재질의 캡 부분과 아가로즈와의 접착성이 좋아서 캡의 분리 과정에서 아가로즈가 깨어지는 경우가 종종 발생하였다. 셋째, 상판 및 하판에 형성되어 있는 정렬용 핀은 정렬에만 도움을 줄 뿐 상판과 하판을 단단히 압착하는 것에는 도움을 주지 못하였다. 따라서 몰딩 시에 상판과 하판 사이에 아가로즈가 스며들어, 분리 시에 쉽게 분리가 되지 않았다. 때문에 분리 과정에서 과도한 힘이 필요했고, 결과적으로 스캐폴드의 형상이 뭉개지거나, 정렬이 틀어지는 문제점이 발견되었다. 따라서 몰드의 재질 및 구조를 다소 수정하였다.

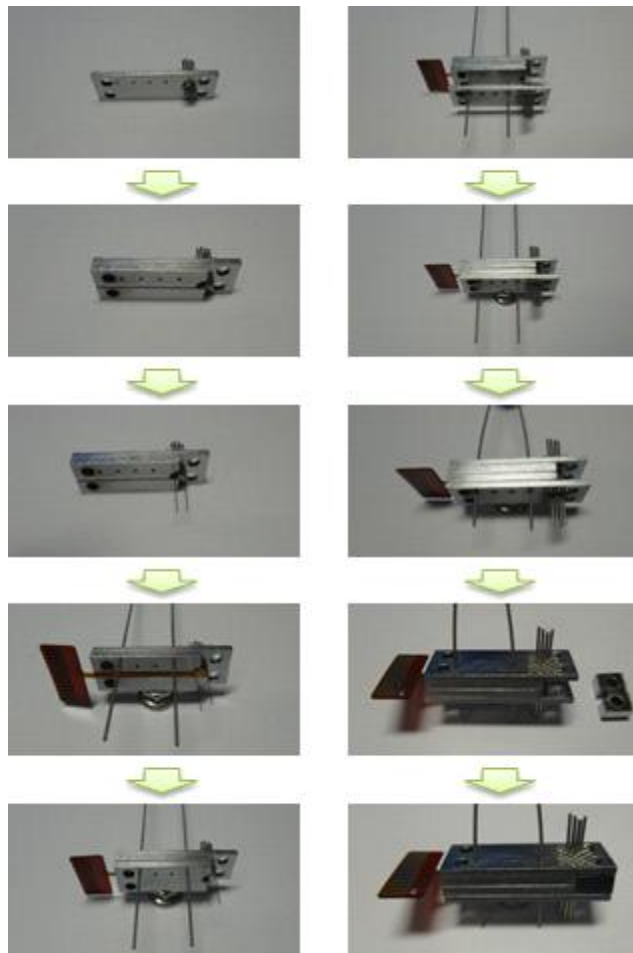


그림 27. 폴드 틀을 이용한 일체화 과정도

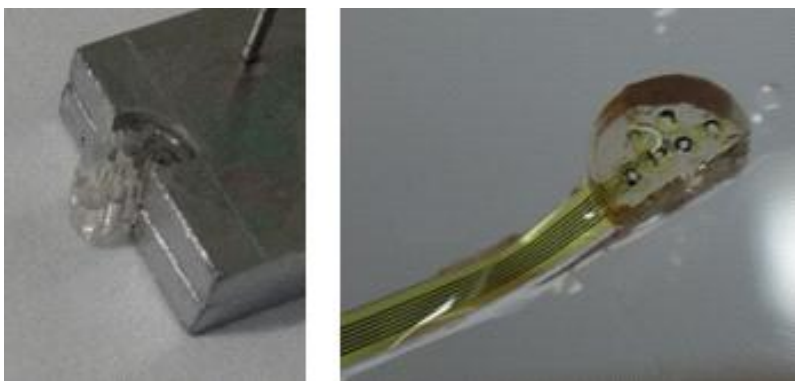


그림 28. 시브 전극과 일체화된 스캐폴드 형상

수정된 일체화용 몰드는 우선 재질을 금속 재질에 플라스틱의 일종인 PEEK 재질로 변경하였다. 또한 정렬용 pipe는 상판과 일체화된 형태로 제작하기 위하여 PEEK 기둥에 기계가공으로 구멍을 뚫어 제작하였다. 상판과 하판의 정렬은 2개의 볼트를 이용하여 정확하게 정렬되도록 하였으며, 동시에 꼭 죄으로써 상판과 하판이 단단하게 압착이 되도록 설계하였다. 이외의 정렬 메커니즘을 이전 몰드와 동일하게 하였으며, 보다 향상된 일체화 결과를 얻을 수 있었다.

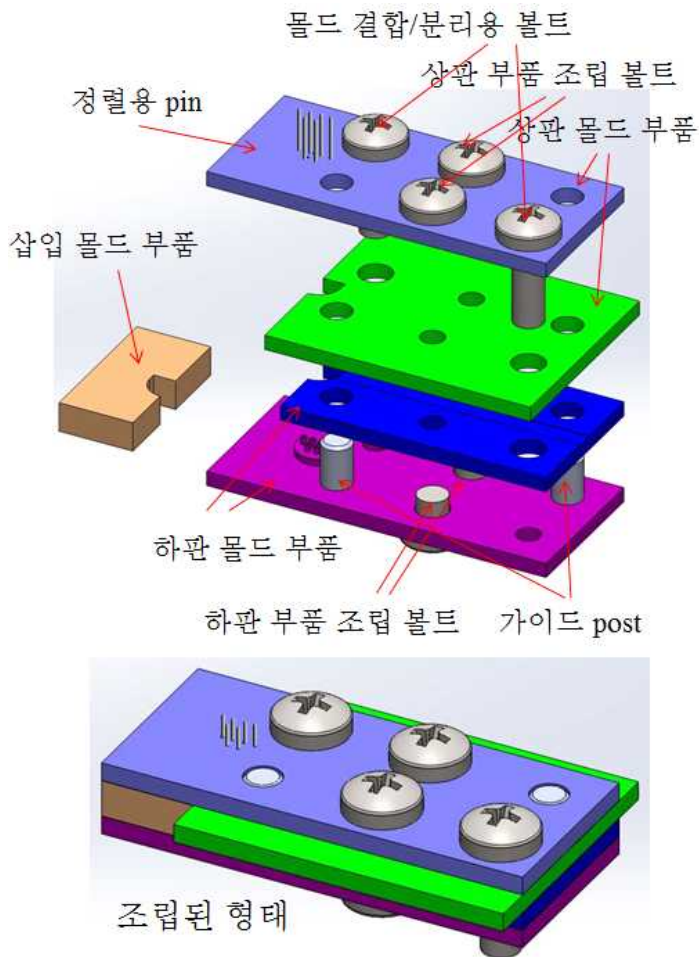
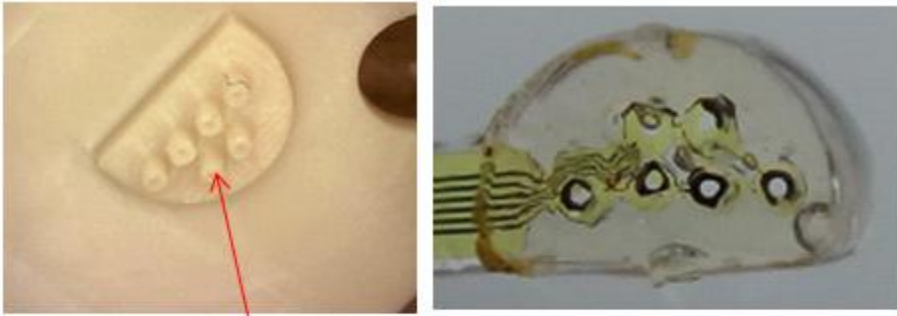


그림 29. 수정된 디자인의 일체화용 몰드 구조



채널 형상용 pipe

그림 30. 몰드에 가공 제작한 채널 형상용 pipe의 사진과 일체화된 신경 소자의 사진

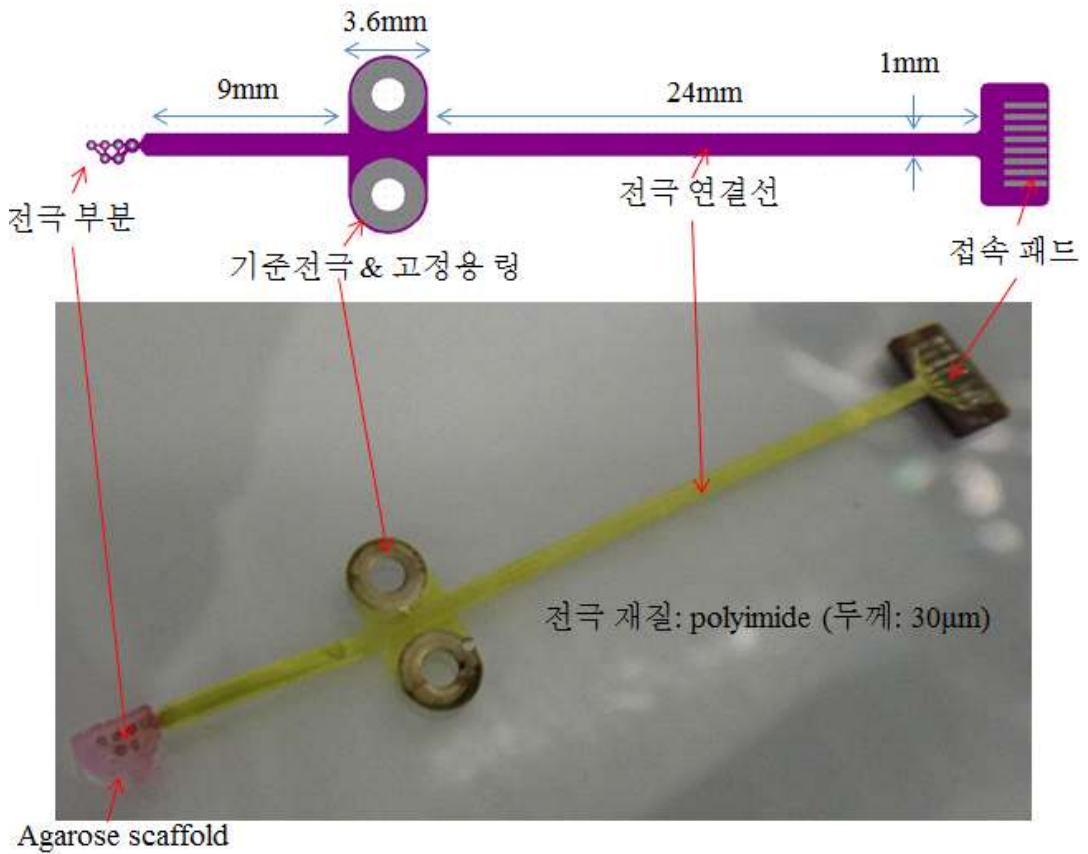


그림 31. 일체화된 신경 전극의 모습

### 4.3. 신경 소자 이식 수술

#### 4.3.1. 신경 소자의 척수 고정법

신경 소자의 이식 수술은 재생 효능 전임상 수술과 동일하게 T9 위치에 하였다. 이를 위한 척추의 절개 및 hemisection lesion을 동일하게 적용하였다.

하지만, 스캐폴드의 재생 효능 전임상 수술과는 달리 신경 소자에는 스캐폴드의 내부에 외부로 이어지는 전극이 embedding 되어 있다. 따라서 외부에서 전극이 흔들리는 경우 척수에 이식되어 있는 스캐폴드까지 통째로 움직일 우려가 있다. 이를 방지하기 위해 신경 소자에는 링 형태의 기준 전극 구조가 포함되어 있어 suture를 통해 일차적으로 고정할 수 있게 되어 있다.

이를 더욱 보완하기 위하여 신경 소자의 이식 후에 생체 접착용인 fibrin glue (그린플라스트키트, 녹십자)를 이용하여 추가적으로 고정하는 방법을 시도하여 보았다. 기존의 아가로즈 막을 이용하여 고정하는 방법 및 고정을 전혀 하지 않고 이식하는 방식을 동시에 시도한 후 약 1달 뒤에 쥐를 해부하여 척수에 고정된 신경 소자의 상태를 확인하여 보았다.

그 결과 신경 소자를 척수에 고정하지 않는 경우에 시브형 신경 전극이 스캐폴드 내부로부터 빠져나와서 척수 내부에 존재하지 않는 현상이 50%의 확률로 관찰되었다(n=4). 반면 피브린을 고정하는 방법이나 아가로즈 필름을 이용한 방법은 둘 다 스캐폴드 내부에 시브형 신경 전극이 있는 것으로 관찰되었다. 하지만 피브린 글루를 이용한 경우 아가로즈

스캐폴드와 엉켜붙어 있는 것이 관찰되었다. 피브린 글루는 기본적으로 무독성이나, 스캐폴드 내부의 채널 또는 스캐폴드와 척수 신경 사이에 피브린 글루가 스며들 수 있는 가능성이 제기되었다. 따라서 기존의 방식인 아가로즈 필름을 이용하여 고정하는 방법을 그대로 사용하는 것이 최선으로 결론 내렸다.

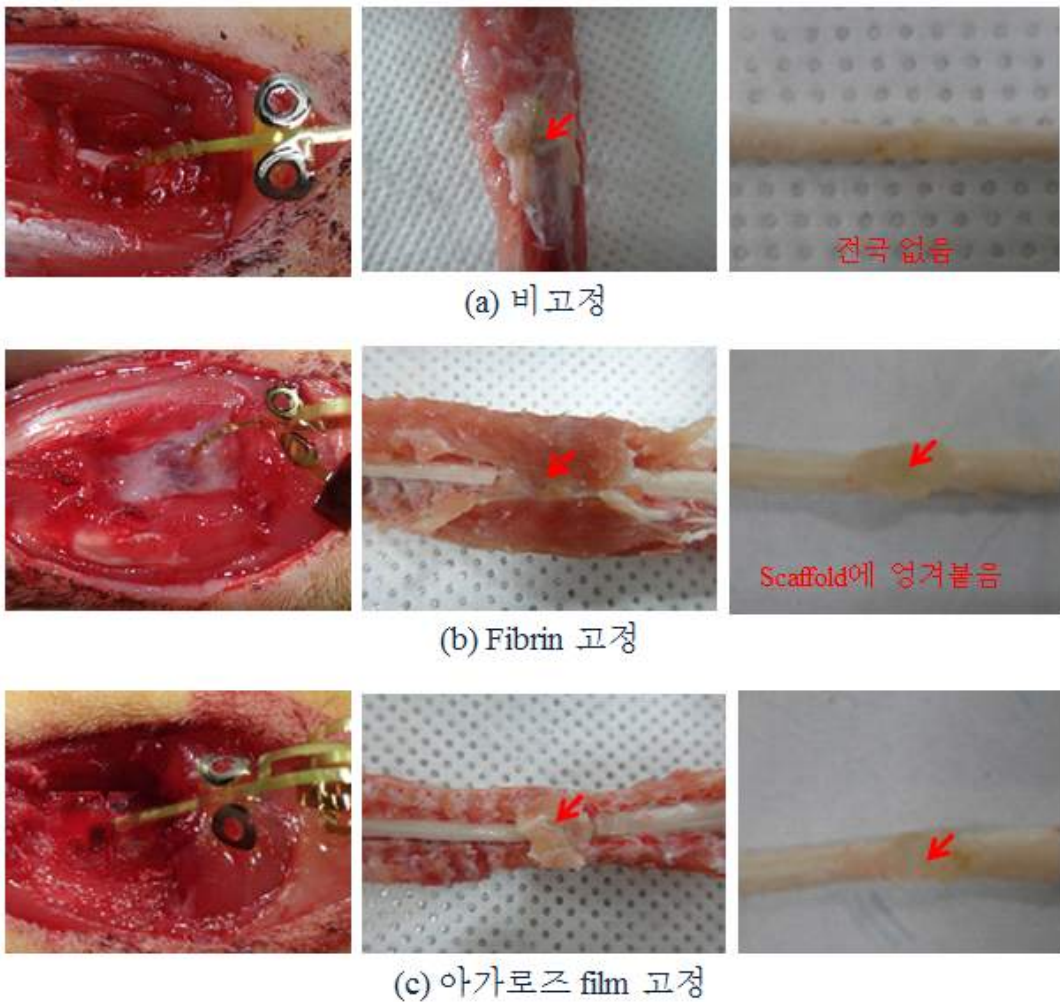


그림 32. 척수에 신경소자를 고정하기 위한 방법 비교

### 4.3.2. 신경 소자 인터페이스 보드 고정법

제작한 신경 소자는 스캐폴드의 재생 효능 확인을 위해 사용되었던 hemisection lesion model의 쥐에 이식되었다. 수술 방법은 아래와 같다. 우선 척추의 절개 및 척수의 절개과정은 스캐폴드의 재생 효과 확인 실험과 동일하게 척수의 절반을 잘라서 축출하는 방법으로 진행하였다. 그런 다음 일체화된 전극을 척수의 내부에 이식하고 척수 근육 및 쥐의 외피를 봉합하였다. 최종적으로 전극의 패드를 인터페이스 보드에 삽입하고, 쥐의 등에 고정을 하였다.

인터페이스 보드는 신경전극과 측정용 장비의 소켓을 연결하여 주기 위한 매개체로 사용하기 위해 별도로 PCB(printed circuit board)로 제작하였다. 인터페이스 보드의 크기는 9mm × 9mm로 제작하여서 쥐의 등에 장착될 수 있도록 크기를 최소화 하였다. 인터페이스에는 Omnetics connector가 부착되어 있어 측정기기에 접속될 수 있도록 하였다.



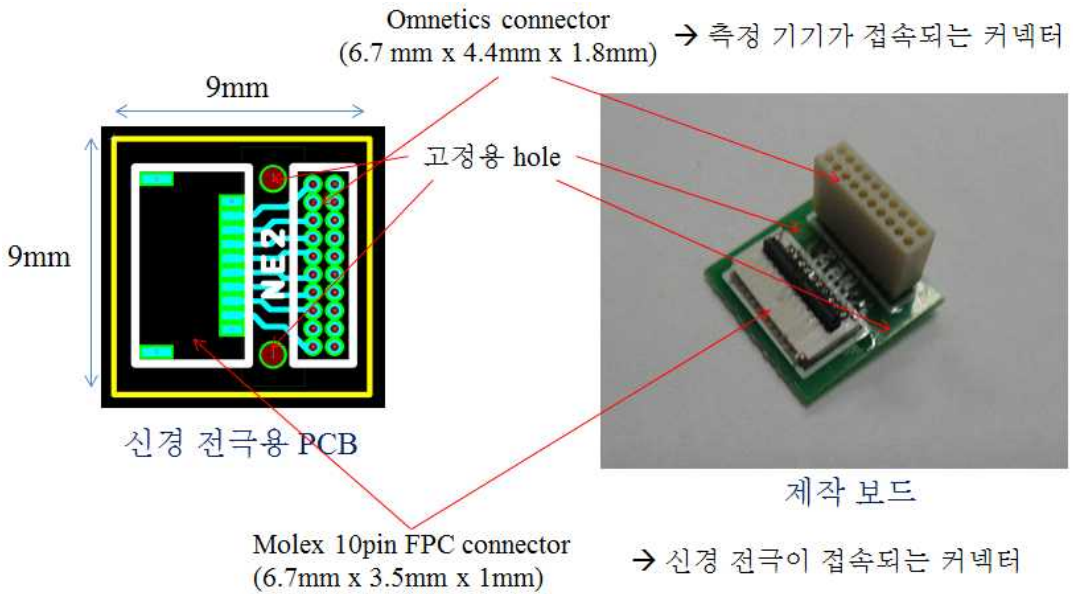


그림 33. 신경전극과 측정 기기의 인터페이스 보드의 구조

살아 있는 쥐에 고정하기 위해 2가지의 접근 방법을 시도하였다. 첫째 방법은 쥐의 등에 인터페이스 보드를 봉합사로 꿰매어서 고정하였다. 두 번째 방법은 생체 접착력이 어느 정도 있는 dental cement를 이용하여 고정하였다. 그러나 봉합사를 이용한 방법은 3~4일 이내에, dental cement를 이용한 방법은 일주일 이내에 고정이 떨어졌다. 신호측정을 원활히 하기 위해서는 인터페이스 보드가 최소한 한 달 이상 쥐에 부착된 채로 유지되어야 한다. 따라서 위의 두 방법으로 효과적인 고정이 어려운 것으로 결론 내렸다.



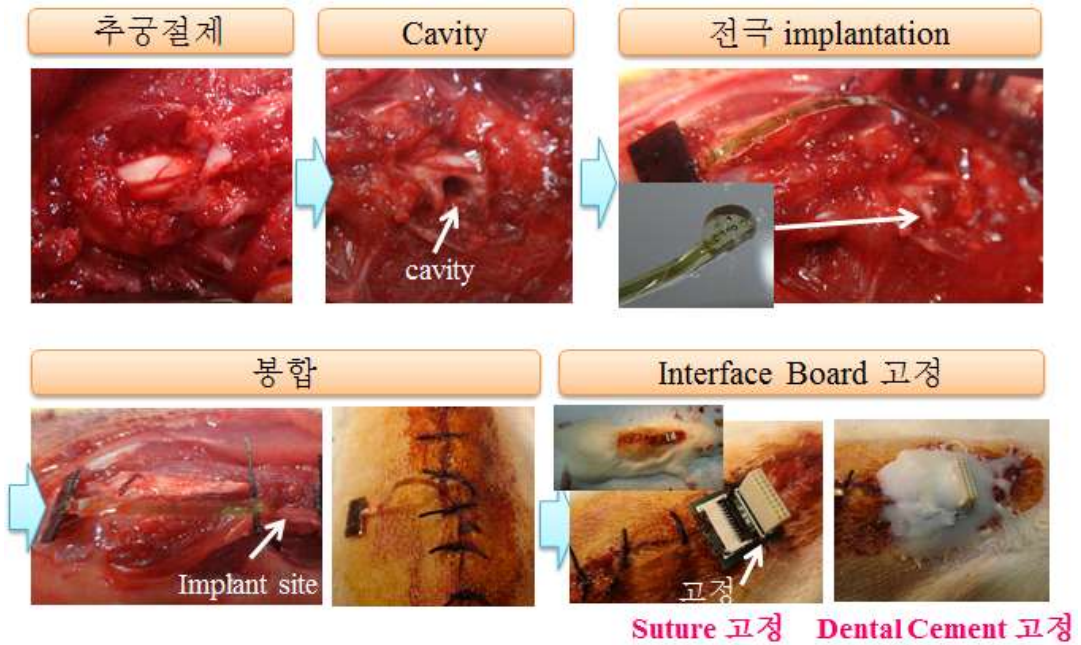


그림 34. 이식 수술 진행 과정 및 인터페이스 고정 시도 방법

쥐는 끊임없이 움직이기 때문에 이 과정에서 쥐의 체외에 고정된 인터페이스 보드가 떨어질 가능성이 매우 크다. 또한 인터페이스 보드가 부착되어 있는 면에서 통증이 느껴지는지 떼어내기 위해 애쓰는 것이 관찰되었다.

따라서 인터페이스 보드는 체외에 고정하는 방법이 아닌 쥐에 입히는 옷(rat jacket)에 인터페이스 보드를 고정하는 방법을 선택하였다. 원래 rat jacket은 약물 전달 시에 쥐가 움직이더라도 약물 전달 튜브가 빠지지 않도록 고정하는 용도로 사용하지만, 본 연구에서는 인터페이스 보드를 부착하기 위한 용도로 활용하였다.

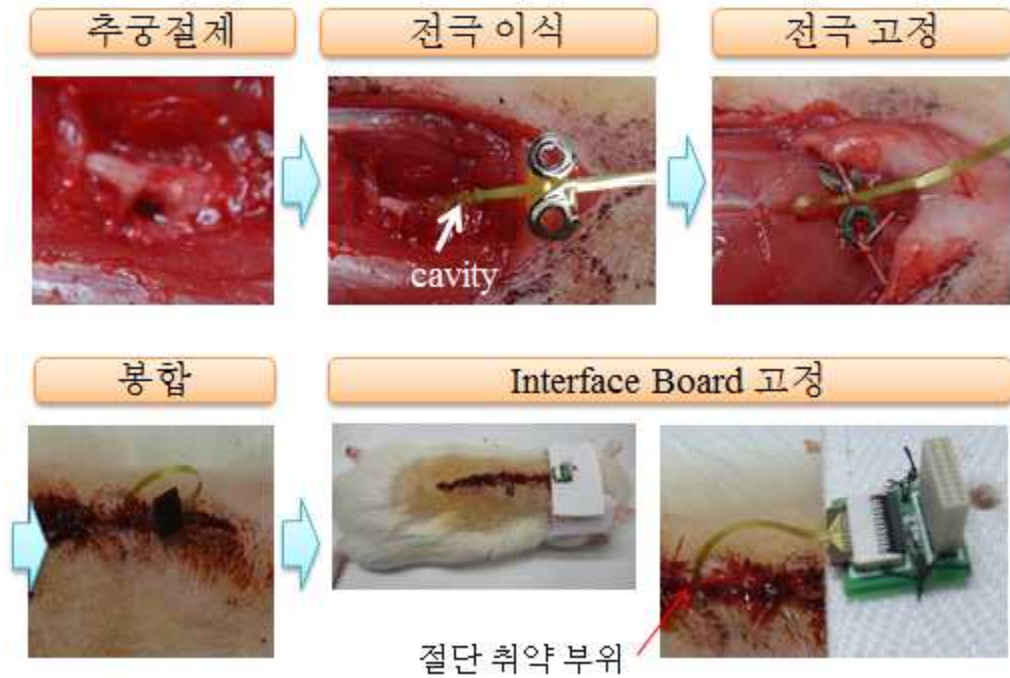


그림 35. Rat jacket을 이용하여 인터페이스 보드를 고정하는 수술법

Rat jacket에 인터페이스 보드를 고정하여 이식 수술을 진행한 결과 몇 가지 다른 문제점이 발견되었다. 우선 신경 소자의 연결선이 체외로 빠져 나오는 부분이 절단에 취약한 문제점이 발견되었다. 이는 쥐가 움직임에 따라 rat jacket이 움직일 때 여분의 길이 부분이 부족하여 힘이 가해지거나, 임의로 rat이 끊는 것으로 파악되었다. 이와 더불어 쥐가 움직이는 과정에서 세로로 인터페이스 보드에 고정되어 있는 커넥터가 쥐 케이지에 걸려서 손상될 수 있는 위험성이 제기되었다. 따라서 인터페이스 보드를 rat jacket에 고정하는 방법 및 인터페이스보드에 고정되는 커넥터의 장착 방법을 수정하였다. 즉, 인터페이스 보드의 커넥터를 가로 방향으로 변경하는 한편, 인터페이스 보드가 rat jacket의 아래쪽에 감추어지

도록 하여 쥐의 움직임 또는 앞발에 의한 인터페이스 보드의 파손을 최대한 보호하도록 하였다.

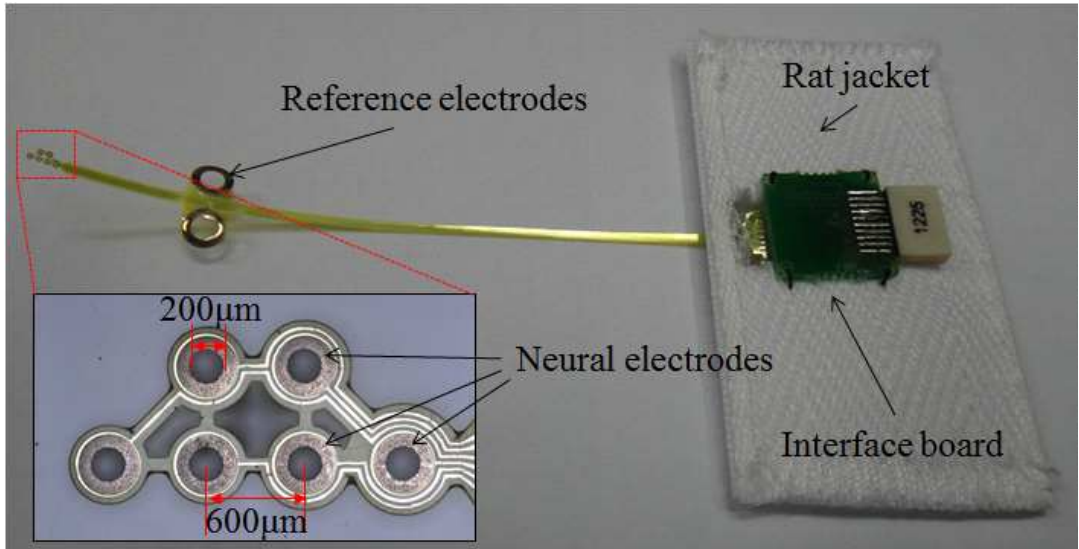


그림 36. 인터페이스 보드 보호를 위해 변경하여 rat jacket에 부착한 신경 소자의 사진

수술 방법은 이전 이식 방법과 동일하게 진행하였다. 다만 인터페이스 보드가 장착된 면이 더 이상 위로 노출되지 않도록 뒤집어서 장착되었다. 또한 rat jacket이 느슨해져서 벗겨지지 않도록 rat jacket의 후크에 고무줄을 걸어 고정하였다.

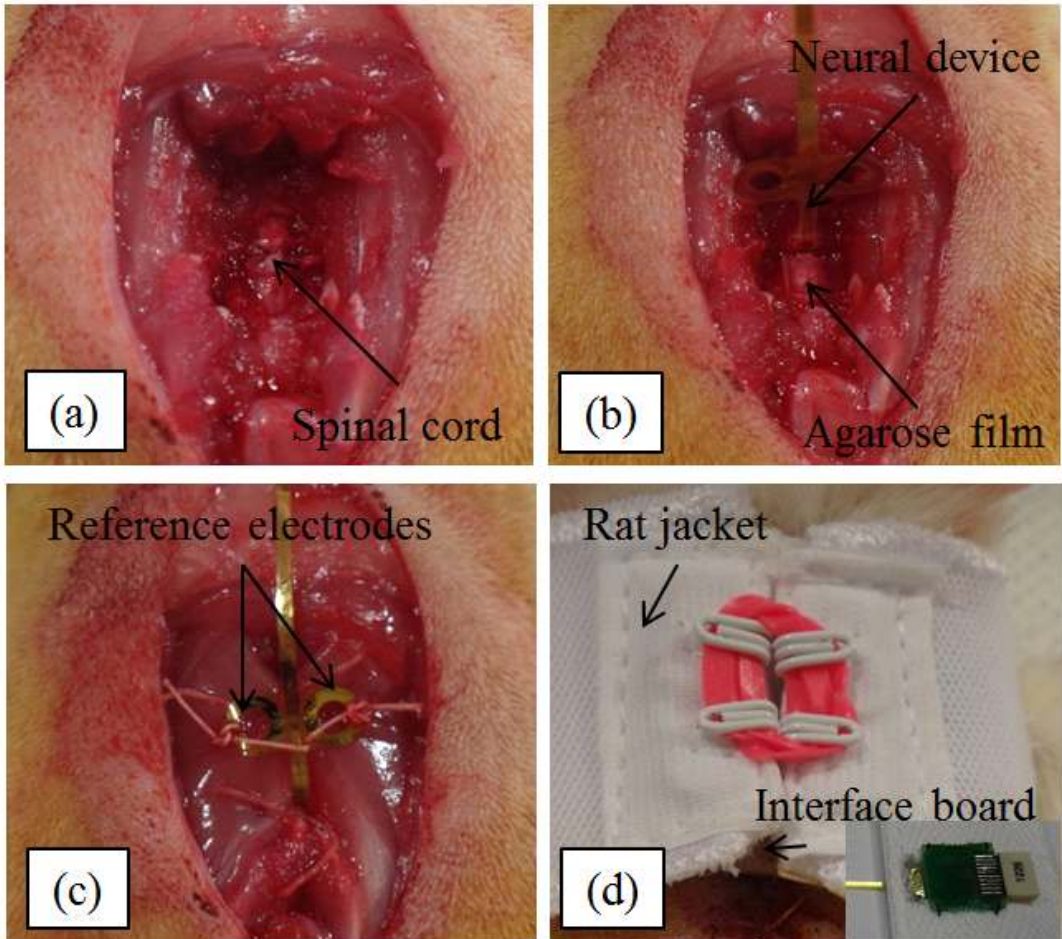


그림 37. 전극의 이식 수술 과정도. (a) 척수의 절단 (b) 전극의 삽입 (c) 기준 전극의 고정 (d) 봉합 및 rat jacket을 이용한 인터페이스보드의 고정

#### 4.4. 신경소자의 신경 신호 측정

##### 4.4.1. 신경소자의 임피던스 측정

신경 소자의 이식 수술에 앞서 신경 소자의 시브형태 신경 전극이 잘 동작하는 지를 확인하기 위하여 임피던스를 측정하였다. 측정 장비는

potentiostats (AMETEK-Princeton Applied Research, VersaSTAT)를 사용하였으며, 기본적인 셋업은 나노와이어의 임피던스 측정과 동일한 셋업을 사용하였다. 그 결과 1kHz에서 17.9k $\Omega$ 의 매우 좋은 임피던스 특성을 확인하였다. 아울러 인터페이스 보드를 이용한 연결 상태가 정상적임을 확인하였고, 6개 채널 모두가 잘 동작하는 것을 확인하였다.

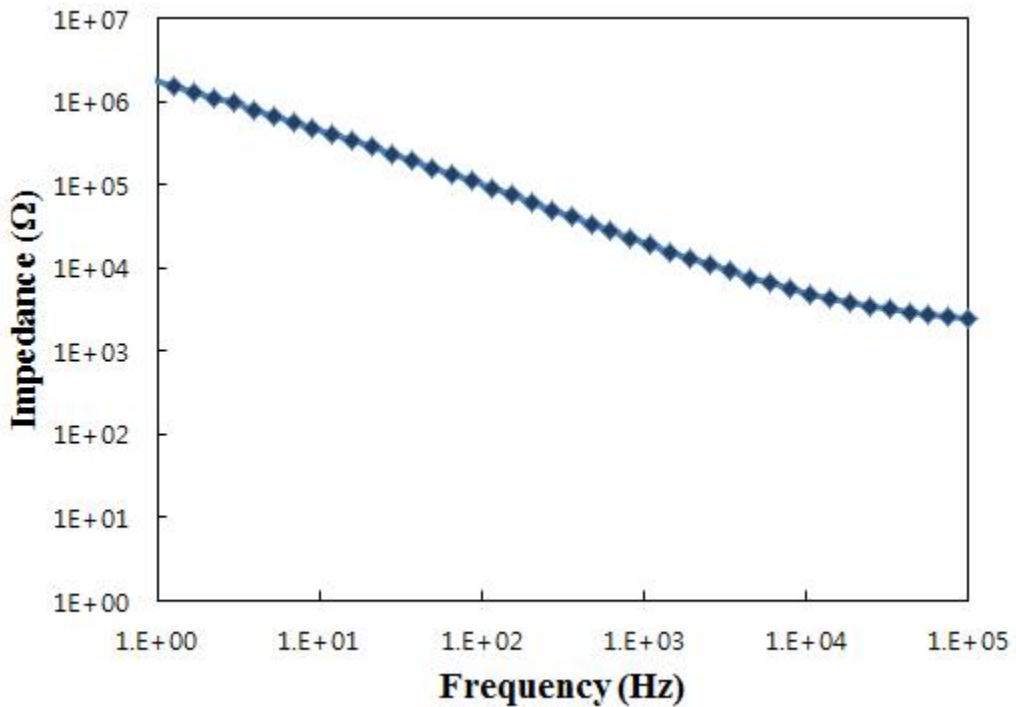


그림 38. 제작한 신경 전극의 임피던스 측정 결과 (1kHz에서 17.9k $\Omega$ )

#### 4.4.2. 신경 신호의 측정 방법

신경 신호의 측정을 위한 장비로 Digital Lynx (Neuralynx, digital data acquisition systems) 장비를 사용하였다. 측정에 사용한 장비는 총 32채널의 AD converting channel을 가지고 있어 측정이 가능하며, 뇌 및 척수,



말초 신경의 신경 신호를 읽을 수 있다. 신호의 측정 샘플링 레이트는 32kHz로 세팅하였으며, 신호의 입력 범위는  $\pm 200\mu\text{V}$ 로 설정하였다. 기준 전극인 신경 소자 내에 전극 구조가 포함되어 있으므로 animal ground로 잡았다. 신경 신호의 잡음 제거를 위해 DSP filtering을 하였으며, FIR 필터를 사용하여 low cut은 300Hz, high cut은 5kHz로 설정하였다. 신경 신호는 일반적으로 1kHz 대역이고, 전원 주파수 등이 대부분 60Hz 대역이므로 위와 같이 잡음 제거 필터링을 설정하였다.

인위적인 자극에 의한 신경신호의 획득을 위하여 부드러운 솔이 있는 브러쉬로 마취된 쥐의 하체를 자극하는 방식을 사용하였다. 쥐의 마취는 zoletil과 rompun을 3:1로 섞어서 사용하였으며, 강하게 마취할 경우 감각 신경까지 마비될 수 있으므로 가능한 약하게 마취를 수행하였다. 하체를 브러쉬로 자극하는 방식을 사용하면 하체로부터의 감각 신호를 측정할 수 있다. 신경 소자의 이식 부위가 T9 위치의 척수이므로, 쥐의 하체 부위를 자극하게 되면 감각 신호가 척수를 통해 뇌로 이동하게 되고, 이 경우 T9 위치를 지나게 된다. 단 이식된 위치가 척수의 오른쪽이므로 왼쪽 부위를 자극할 때 신경 신호가 측정될 수 있다.



(a)



(b)



(c)



(d)

그림 39. 쥐 하체에 브러쉬를 이용한 촉각 신경 자극을 가하여 신경 신호를 발생시키는 모습

## 4.5. 신경 신호 측정 결과 분석

### 4.5.1. 측정된 신경 신호

브러쉬 자극에 의해 발생한 신경 신호를 측정하였다. 신경 신호는 일반적으로 pulse 형태에 신호의 크기가 수백  $\mu\text{V}$  수준이다. 측정된 신경 신호도  $200\mu\text{V}\sim 400\mu\text{V}$  수준을 보였다. 신호 측정 과정에서 순간적으로 높

은 peak를 보이는 경우가 있었으나, 이 경우 신경 소자의 모든 채널에서 동일한 신호가 관측되는 것으로 보아 외부 요인에 의한 노이즈 또는 artifact로 추정되어 신호 측정 결과에서 배제하였다. 측정된 신호는 pulse 형태보다는 다발형태의 연속적 신호가 더 많이 감지되었다. 이는 MEA(metal electrode array)와는 달리 단일 신경 세포로부터 신경 신호를 획득하지 않고 척수 신경 다발로부터 신경 신호를 획득하기 때문에 다수의 신경 세포로부터 신호를 획득하기 때문인 것으로 추정된다.

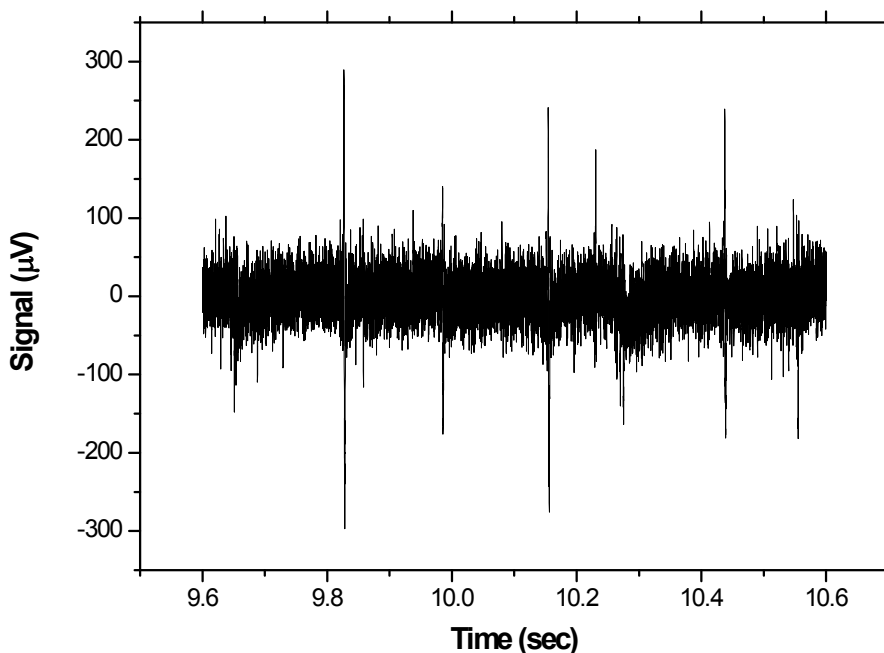


그림 40. 자발적으로 발생한 신경 신호의 측정 그래프

그림 40은 신경 자극이 주어지지 않은 경우에 자발적으로 발생한 신경



신호의 파형을 나타낸다. 주기적인 자발적 신경 신호가 관찰되었으며, 신호간의 간격은 약 0.1초~0.2초로 관찰되었다. 신경 신호의 형태는 주로 단일 펄스에 가까운 형태를 가졌으며, 신호의 크기는 200~600 $\mu$ V 수준이었다.

그림 41은 브러쉬를 이용하여 쥐 하지의 촉각 신경을 자극하였을 때 발생한 신경 신호의 측정 그래프를 나타낸다. 자극 시점과 동시에 신경 신호의 스파이크 다발이 측정되었다. 그래프의 4초 지점에서 자극이 시작되었고, 10초 지점에서 자극을 멈춘 후 16초 지점에서 재 자극이 주어졌다. 자극에 맞추어 신경 신호가 발생하는 것을 그래프로부터 확인할 수 있다.

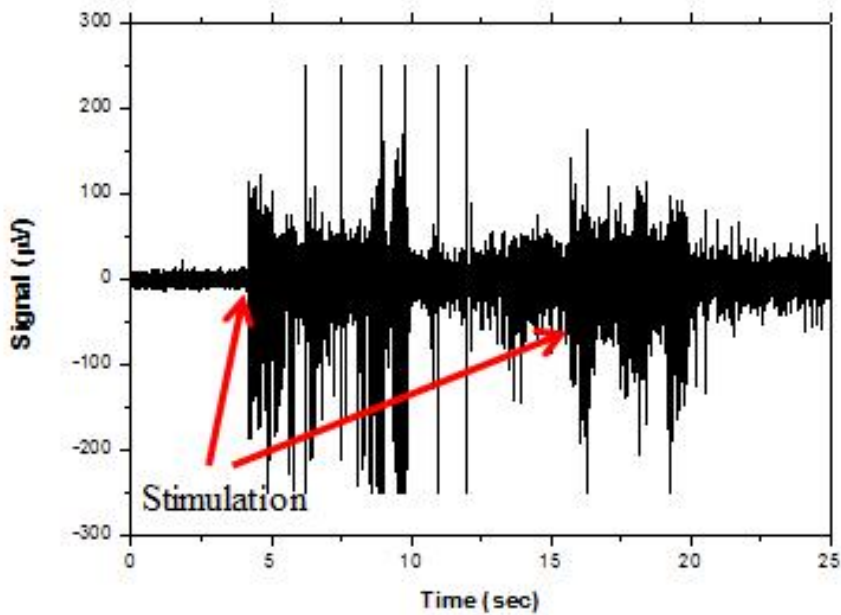


그림 41. 브러쉬를 이용한 촉각 신경의 자극 시 발생한 신경 신호의 측정 그래프

브러쉬를 이용한 촉각 신경 자극 방법은 브러쉬의 털 다발에 의해 자극이 주어지므로, 경우에 따라 짧은 시간 내에 동일 부위에 대한 연속적인 자극이 주어지는 경우가 있다. 그림 42를 보면 0.2초 미만의 짧은 간격을 두고 신경 신호가 연속적으로 발생한 것을 관찰할 수 있다. 이 신경 신호는 브러쉬를 이용한 단일 자극 시에 측정된 신호인데, 이는 브러쉬에 의해 짧은 시간 내에 동일한 자극이 주어졌기 때문에 이와 같은 형태의 신경 신호가 발생하였을 것으로 추정된다.

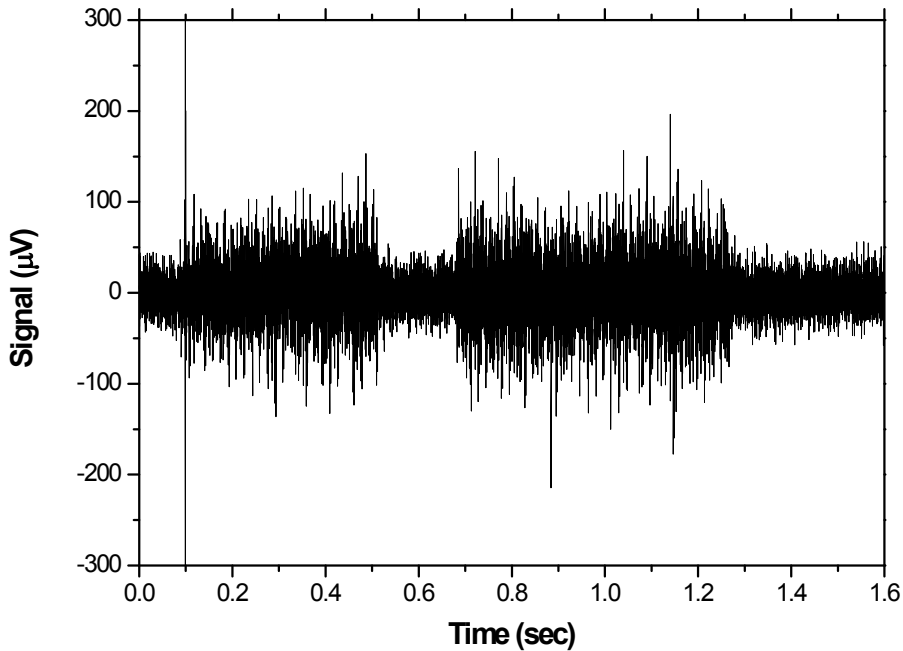


그림 42. 브러쉬 자극 시 짧은 시간 내에 연속적인 신호가 발생한 경우의 신경 신호의 측정 그래프

#### 4.5.2. 신경 신호의 주파수 분석

측정된 신경 신호의 유효성을 검증하기 위하여 측정된 신호의 주파수 분석을 실시하였다. 신경세포는 보통 1ms 근처의 응답 속도를 가지고 있다. 따라서 신경세포에 의한 전기 신호는 1kHz 대역 근방에서 발생하게 되는 특성이 있다. 하지만 뇌와 같이 신경 세포가 밀집되어 있는 중추 신경계인 경우 수십 Hz 수준으로 응답 속도가 비교적 느리고, 말초 신경계의 경우 1kHz가 넘는 매우 빠른 신호 응답 특성을 가지는 것으로 알려져 있다. 따라서 주파수 분석을 통해 신경 신호에서 발생한 주파수 피

크가 어떤 주파수 대역에서 가장 높게 나타나는지를 파악하는 것이 대단히 중요하며, 적절한 범위에 포함되는지를 통해 신경 신호인지 여부를 추정할 수 있다.

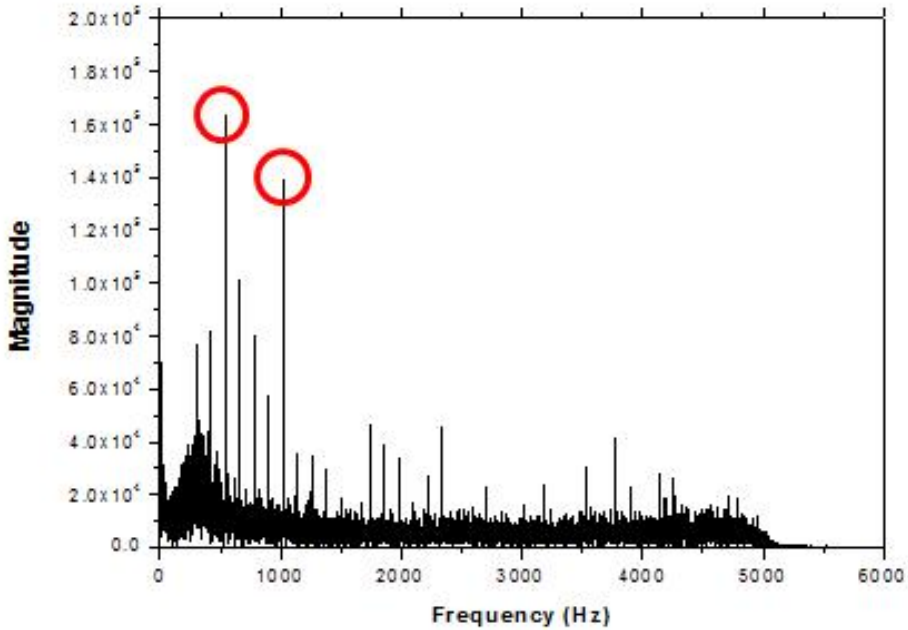


그림 43. 자발적으로 발생하는 신경 신호의 주파수 분석

먼저 자발적으로 발생한 신경 신호에 대하여 주파수 분석을 실시하였다. 그림 43은 해당 결과를 보여주며, 500Hz와 1kHz 대역에서 가장 높은 주파수 피크를 관찰할 수 있다. 특히 주파수 성분의 대부분이 500Hz~1kHz 대역에 밀집되어 나타나는 특성을 보인다. 이는 읽어 들인 신호가 신경 신호임을 추정할 수 있는 근거가 될 수 있다. 측정된 신호

의 또 하나의 특징으로는 발생한 신경 신호의 주파수 분포가 불연속적이라는 점이다. 이는 측정된 신경 신호가 제한적인 숫자의 신경 세포로부터 측정된 것임을 의미한다고 볼 수 있다.

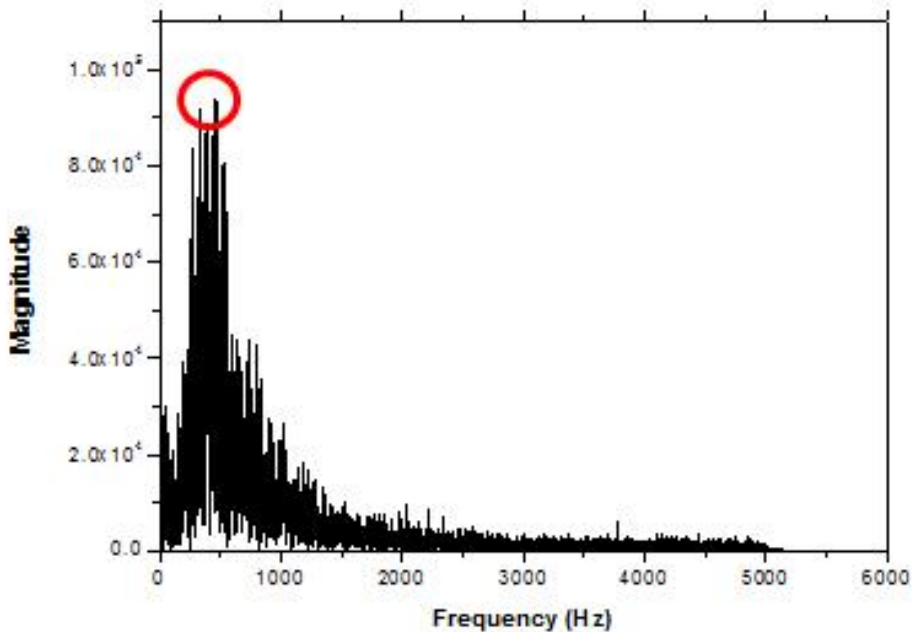


그림 44. 브러쉬 자극에 의해 발생한 신경 신호의 주파수 분석

브러쉬 자극에 의해 발생한 신경 신호에 대해서도 주파수 분석을 수행하였다. 그림 44를 보면 주파수 분석 결과 자발적으로 발생한 신경 신호의 경우와 유사한 경향의 주파수 분포를 확인할 수 있다. 하지만 자발적으로 발생한 신경 신호의 경우보다 주파수 성분의 밀도가 500Hz를 중심으로 대폭적으로 증가한 것을 확인할 수 있다. 이는 브러쉬 자극에 의해

다수의 촉각 신경이 자극을 받아 많은 수의 신경 세포로부터 신호가 기록되었기 때문이라고 추정할 수 있다. 측정된 신호의 주파수 스펙트럼에서 500Hz 대역의 피크가 선명하게 관찰되었기 때문에 신경 신호로 추정된다.

## 5. 결론

### 5.1. 결론

손상된 척수 신경의 손상 여부를 파악하거나, 재생시키면서 동시에 재생된 척수 신경으로부터 신호를 읽을 수 있는 이식형 신경 소자가 제안되었다.

이를 위해 손상된 척수를 재생시킬 수 있는 아가로즈 스캐폴드의 전임상 실험을 진행하였다. 신경의 재생을 도울 수 있도록 300 $\mu$ m 직경의 신경 도관의 내부에 ghrelin 및 matrigel을 섞어서 채워 넣었다. 1달 이상 보호 관찰을 실시하며, 운동기능 향상을 확인한 결과 스캐폴드를 이식한 경우, 특히 스캐폴드에 ghrelin을 탑재한 경우 동일한 척수 손상을 받은 쥐에 비해 상당히 유효한 기능향상을 확인할 수 있었다. 스캐폴드가 이식된 척수는 적출되어 조직학 검사를 수행하였으며, 그 결과 아가로즈 스캐폴드가 2달 이상 원형을 유지하고 있으며, 조직과 잘 결합되어 있음을 확인하였다. 또한 스캐폴드 내부에 신경 조직이 침투하였음도 확인할 수 있었다.

척수의 손상 정도를 파악하기 위한 신경 손상 감지 센서의 제작을 위해 고감도 나노와이어의 특성을 확인하였다. 임피던스 및 세포 독성, 세포의 형상 측면에서 실험을 실시하였으며, 후보군인 ZnO 나노로드, 은 나노와이어, CNT 중 CNT가 모든 면에서 가장 우수함을 확인하였다. 신경 손상 감지 센서는 polyimide를 기반으로 MEMS 공정을 이용하여 제작되었으며, 신경 손상 부위에 발생하는 신경 교상흔의 주요 구성 물질인 CSPG의 농도를 획득함을 1 $\mu$ g/ml에서 20 $\mu$ g/ml의 범위에서 확인하였다. CSPG의 농도가 10 $\mu$ g/ml을 상회시 신경 재생을 억제하는 것으로 보고되

어있으므로, 제작한 센서는 척수 손상을 적절히 감지할 수 있다.

수화젤 재질의 척수 신경 재생용 스캐폴드와 polyimide 재질의 신경 전극이 일체화된 신경소자를 제작하기 위한 몰드 틀을 제안하였다. 제안한 몰드는 스캐폴드에 형성되어 있는 신경 재생용 도관과 시브형태의 신경 전극이 50 $\mu\text{m}$  이내에서 기계적으로 정렬될 수 있도록 설계하였고, 일체화가 성공적으로 됨을 확인하였다. 일체화된 신경 소자는 전임상 신호 획득을 위하여 쥐에 이식되었다. 이식시 신경 소자와 외부 신경 신호 검출 장비와의 접속을 위한 인터페이스 보드를 장착하는 방법에 대해 다양한 방법을 고찰하였으며, rat jacket을 이용한 고정 방법이 가장 나은 결과를 보임 결론 내렸다. 신경 소자가 이식된 쥐의 신경 신호를 브러쉬를 이용하여 하체를 자극하는 방법으로 획득하였다. 200~400 $\mu\text{V}$  크기의 신경 신호가 관측되었으며, 자발적으로 발생하는 신경 신호 또한 관찰되었다. 발생한 신경 신호의 주파수 분석 결과 500Hz에서 1kHz 대역에서 높은 주파수 성분이 관찰되었으며, 이를 통해 신경 세포에 의해 발생한 신경 신호로 추정할 수 있다.

위의 결과를 토대로 제안한 이식형 신경 소자는 척수 신경의 재생을 도우면서, 신호를 획득할 수 있음을 확인하였다. 또한 척수 손상 모니터링 신경 소자를 통해 손상 정도를 모니터링할 수 있는 가능성을 검증하였다. 이와 같이 제안된 신경소자들이 척수 손상 환자에게 임상적으로 적용된다면, 궁극적으로 신경 보철의 인터페이스로써 활용할 수 있을 것으로 기대된다.



## 5.2. 추후 과제

본 연구 결과는 추후에 척수 손상의 재생 분야 및 인공 보철 장치를 위한 신경 인터페이스 장치에 걸쳐 다양하게 적용될 수 있을 것으로 기대 된다. 이를 위해서는 추후에 다음과 같은 연구가 더 이루어질 수 있다.

척수 재생을 위해 *ghrelin* 뿐만 아니라 줄기 세포와 같이 지지를 도울 수 있는 세포를 혼합하여 채널에 넣는 연구가 가능하다. 줄기 세포를 이용하여 척수 손상의 재생을 도우려는 시도가 있었으나, 아가로즈 스캐폴드를 비이클로 삼아 더욱 연구를 발전 시킬 수 있을 것이다.

신경 인터페이스 분야에 신경 소자를 적용하기 위해서는 벌크한 형태의 인터페이스 보드를 축소하고, 유선이 아닌 무선형일 필요가 있다. 무선으로 외부에 연결이 가능할 때, 신경 신호를 효과적으로 활용할 수 있으며, 인공 보철을 비롯한 다양한 매체와 연결 가능하기 때문에 척수 손상 환자의 움직임 보조를 포함한 신경 인터페이스의 확장이 가능하다.

신경 소자를 통하여 신경 신호를 획득하는 것에 성공하였으나, 이 신호가 정확하게 무엇을 의미하는지 분석하는데 까지는 연구가 이르지 못하였다. 신경보철에 신경소자를 적용하기 위해서는 측정된 신경 신호와 연결된 신경 간의 명확한 분석이 추후에 이루어져야 할 것이다. 이를 위해서는 신경 소자의 신호 측정 공간적 분해능의 향상이 필요하며, 정확하게 척수 신경의 위치와 접촉하는 방법에 대한 추가적 연구가 지속되어야 할 것이다.

## 참고 문헌

- [1] Jerry Silver and Jared H. Miller. Regeneration beyond the glial scar. *Nature Reviews Neuroscience* 2004;5:146-56.
- [2] Asya Rolls, Ravid Shechter, Michal Schwartz. The bright side of the glial scar in CNS repair. *Nature Reviews Neuroscience* 2009;10:235-41.
- [3] Michael V. Sofroniew. Molecular dissection of reactive astrogliosis and glial scar formation. *Trends in Neurosciences* 2009;32(12):638-47.
- [4] William B. Naso, Phanor L. Perot, Jr., Russell D. Cox. The neuroprotective effect of high-dose methylprednisolone in rat spinal cord hemisection. *Neuroscience Letters* 1995;189:176-78.
- [5] Christine E. Schmidt and Jennie Baier Leach. NEURAL TISSUE ENGINEERING: strategies for repair and regeneration. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* 2003;5:293-347.
- [6] Martin E. Schwab. Repairing the injured spinal cord. *Science* 2002;295:1029-31.
- [7] Nicolas N. Madigan, Siobhan McMahon, Timothy O'Brien, Michael J. Yaszemski, Anthony J. Windebank. Current tissue engineering and novel therapeutic approaches to axonal regeneration following spinal cord injury using polymer scaffolds. *Respiratory Physiology & Neurobiology* 2009;169:183-99.
- [8] Stephanie M. Willerth, Shelly E. Sakiyama-Elbert. Cell therapy for spinal cord regeneration. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2008;60:263-76.
- [9] Stephanie M. Willerth, Shelly E. Sakiyama-Elbert. Approaches to neural

- tissue engineering using scaffolds for drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2007;59:325-38.
- [10] H. Tabesh, Gh. Amoabediny, N. Salehi Nik, M. Heydari, M. Yosefifard, S.O. Ranaei Siadat, K. Mottaghy. The role of biodegradable engineered scaffolds seeded with Schwann cells for spinal cord regeneration. *Neurochemistry International* 2009;54:73-83.
- [11] Richard B. North, David H. Kidd, Marianna Zahurak, Carol S. James, Donlin M. Long. Spinal cord stimulation for chronic, intractable pain: experience over two decades. *Neurosurgery* 1993;32(3):384-395.
- [12] Xinyan Cui, James Wiler, Marta Dzaman, Richard A. Altschuler, David C. Martin. In vivo studies of polypyrrole/peptide coated neural probes. *Biomaterials* 2003;24:777-87.
- [13] Jingkuang Chen, Kensall D. Wise, Jamille F. Hetke, Sanford C. Bledsoe. A multichannel neural probe for selective chemical delivery at the cellular level. *IEEE Transactions on Biomedical Engineering* 1997;44(8):760-69.
- [14] John P. Seymour, Daryl R. Kipke. Neural probe design for reduced tissue encapsulation in CNS. *Biomaterials* 2007;28:3594-607.
- [15] Nicolas N. Madigan, Siobhan McMahon, Timothy O'Brien, Michael J. Yaszemski, Anthony J. Windebank. Current tissue engineering and novel therapeutic approaches to axonal regeneration following spinal cord injury using polymer scaffolds. *Respiratory Physiology & Neurobiology* 2009;169:183-199.
- [16] Yinghui Zhong and Ravi V Bellamkonda. *Biomaterials for the central*

- nervous system. *J. R. Soc. Interface* 2008;5:957-75.
- [17] Anjana Jain, Young-Tae Kim, Robert J. McKeon, Ravi V. Bellamkonda. In situ gelling hydrogels for conformal repair of spinal cord defects, and local delivery of BDNF after spinal cord injury. *Biomaterials* 2006;27:497-504.
- [18] Shula Stokols, Mark H. Tuszynski. The fabrication and characterization of linearly oriented nerve guidance scaffolds for spinal cord injury. *Biomaterials* 2004;25:5839-46.
- [19] Xiaojun Yu, George P. Dillon, Ravi V. Bellamkonda. A laminin and nerve growth factor-laden three-dimensional scaffold for enhanced neurite extension. *Tissue Engineering* 1999;5(4):291-304.
- [20] D. A. Houweling, A. J. Lankhorst, W. H. Gispen, P. R. Bar, E. A. J. Joosten. Collagen containing neurotrophin-3 (NT-3) attracts regrowing injured corticospinal axons in the adult rat spinal cord and promotes partial functional recovery. *Experimental Neurology* 1998;153:49-59.
- [21] Xiaowei Li, Eleni Katsanevakis, Xiaoyan Liu, Ning Zhang, Xuejun Wen. Engineering neural stem cell fates with hydrogel design for central nervous system regeneration. *Progress in Polymer Science* 2010.
- [22] Christopher Iannotti, Huayin Li, Ping Yan, Xiaobin Lu, Louisa Wirthlin, Xiao-Ming Xu. Glial cell line-derived neurotrophic factor-enriched bridging transplants promote propriospinal axonal regeneration and enhance myelination after spinal cord injury. *Experimental Neurology* 2003;183:379-93.
- [23] Eve C. Tsai, Paul D. Dalton, Molly S. Shoichet, Charles H. Tator.

- Matrix inclusion within synthetic hydrogel guidance channels improves specific supraspinal and local axonal regeneration after complete spinal cord transection. *Biomaterials* 2006;27:519-33.
- [24] Andres Hurtado, Lawrence D.F. Moon, Veronique Maquet, Bas Blits, Robert Jerome, Martin Oudega. Poly (D,L-lactic acid) macroporous guidance scaffolds seeded with Schwann cells genetically modified to secrete a bi-functional neurotrophin implanted in the completely transected adult rat thoracic spinal cord. *Biomaterials* 2006;27:430-42.
- [25] Eve C. Tsai, Paul D. Dalton, Molly S. Choichet, Charles H. Tator. Synthetic hydrogel guidance channels facilitate regeneration of adult rat brainstem motor axons after complete spinal cord transection. *Journal of Neurotrauma* 2004;21(6):789-804.
- [26] Shula Stokols, Mark H. Tuszynski. Freeze-dried agarose scaffolds with uniaxial channels stimulate and guide linear axonal growth following spinal cord injury. *Biomaterials* 2006;27:443-51.
- [27] Shula Stokols, Jeff Sakamoto, Chris Breckon, Todd Holt, James Weiss, Mark H. Tuszynski. Templated agarose scaffolds support linear axonal regeneration. *Tissue Engineering* 2006;12(10):2777-87.
- [28] Thomas Gros, Jeff S. Sakamoto, Armin Blesch, Leif A. Havton, Mark H. Tuszynski. Regeneration of long-tract axons through sites of spinal cord injury using templated agarose scaffolds. *Biomaterials* 2010;31:6719-29.
- [29] Leonard L. Jones, Martin Oudega, Mary Bartlett Bunge, Mark H. Tuszynski. Neurotrophic factors, cellular bridges and gene therapy for

- spinal cord injury. *Journal of Physiology* 2001;533(1):83-9.
- [30] Xiao Ming Xu, Véronique Guénard, Naomi Kleitman, Patrick Aebischer, Mary Bartlett Bunge. A combination of BDNF and NT-3 promotes supraspinal axonal regeneration into schwann cell grafts in adult rat thoracic spinal cord. *Experimental Neurology* 1995;134(2):261-72.
- [31] Karim Fouad, Lisa Schnell, Mary B. Bunge, Martin E. Schwab, Thomas Liebscher, Damien D. Pearse. Combining schwann cell bridges and olfactory-ensheathing glia grafts with chondroitinase promotes locomotor recovery after complete transection of the spinal cord. *Journal of Neuroscience* 2005;25(5):1169-78.
- [32] Soo Hyun Lee, Jung Hwan Jung, Youn Mee Chae, Jun-Kyo Francis Suh, Ji Yoon Kang. Fabrication and characterization of implantable and flexible nerve cuff electrodes with Pt, Ir and IrO<sub>x</sub> films deposited by RF sputtering. *J. Micromech. Microeng.* 2010;20:035015(8pp).
- [33] T. Stieglitz, H.H. Ruf, M. Gross, M. Schuettler, J.-U. Meyer. A biohybrid system to interface peripheral nerves after traumatic lesions: design of a high channel sieve electrode. *Biosensors and Bioelectronics* 2002;17:685-96.
- [34] Stephanie P. Lacour, James J. Fitzgerald, Natalia Lago, Edward Tarte, Stephen McMahon, James Fawcett. Long micro-channel electrode arrays: a novel type of regenerative peripheral nerve interface. *IEEE Transactions on Neural Systems and Rehabilitation Engineering* 2009;17(5):454-60.
- [35] Yasuhiro Kato et. al. Preliminary study of multichannel flexible neural

- probes coated with hybrid biodegradable polymer. Proceedings of the 28th IEEE EMBS Annual International Conference 2006.
- [36] Dustin J. Tyler and Dominique M. Durand. A slowly penetrating interfascicular nerve electrode for selective activation of peripheral nerves. *IEEE Transactions on Rehabilitation Engineering* 1997;5(1):51-61.
- [37] P. Daubinger, B.L. Fiebich, T. Stieglitz. A novel platinum nanowire-coated neural electrode and its electrochemical and biological characterization. *Micro Electro Mechanical Systems (MEMS), 2011 IEEE 24th International Conference on* 2011;1003-6.
- [38] Xavier Navarro, Thilo B. Krueger, Natalia Lago, Silvestro Micera, Thomas Stieglitz, Paolo Dario. A critical review of interfaces with the peripheral nervous system for the control of neuroprostheses and hybrid bionic systems. *Journal of the Peripheral Nervous System* 2005;10:229-58.
- [39] Tayfun Akin, Khalil Najafi, Robert M. Bradley. A wireless implantable multichannel digital neural recording system for a micromachined sieve electrode. *IEEE Journal of Solid-State Circuits* 1998;33(1):109-18.
- [40] Leigh R. Hochberg et. al. Neuronal ensemble control of prosthetic devices by a human with tetraplegia. *Nature* 2006;442:164-71.
- [41] Abhishek Prasad and Mesut Sahin. Extraction of motor activity from the cervical spinal cord of behaving rats. *J. Neural Eng.* 2006;3:287-92.
- [42] Abhishek Prasad and Mesut Sahin. Characterization of neural activity recorded from the descending tracts of the rat spinal cord. *Frontiers in*

- Neuroscience 2010;4:Article 21.
- [43] Abhishek Prasad, and Mesut Sahin. Chronic recordings from the rat spinal cord descending tracts with microwires. 33rd Annual International Conference of the IEEE EMBS 2011;2993-6.
- [44] Fernando Patolsky, Brian P. Timko, Guihua Yu, Ying Fang, Andrew B. Greytak, Gengfeng Zheng, Charles M. Lieber. Detection, stimulation, and inhibition of neuronal signals with high-Density nanowire transistor arrays. Science 2006;313:1100-4.
- [45] Kathleen W. Meacham, Richard J. Giuly, Liang Guo, Shawn Hochman , Stephen P. DeWeerth. A lithographically-patterned, elastic multi-electrode array for surface stimulation of the spinal cord. Biomed Microdevices 2008;10:259-69.
- [46] Joanne Raghunath, John Rollo, Kevin M. Sales, Peter E. Butler, Alexander M. Seifalian. Biomaterials and scaffold design: key to tissue-engineering cartilage. Biotechnol. Appl. Biochem. 2007;46:73-84.
- [47] Hiroshi Nomura, Charles H. Tator, Molly S. Choichet. Bioengineered strategies for spinal cord repair. Journal of Neurotrauma 2006;23(3/4):496-507.
- [48] Jeanie L. Drury, David J. Mooney. Hydrogels for tissue engineering: scaffold design variables and applications. Biomaterials 2003;24:4337-51.
- [49] K. Rezwan, Q.Z. Chen, J.J. Blaker, Aldo Roberto Boccaccini. Biodegradable and bioactive porous polymer/inorganic composite scaffolds for bone tissue engineering. Biomaterials 2006;27:3413-31.



- [50] Valery Normand, Didier L. Lootens, Eleonora Amici, Kevin P. Plucknett, Pierre Aymard. New Insight into Agarose Gel Mechanical Properties. *Biomacromolecules* 2000;1:730-38.
- [51] Valery Normand, Pierre Aymard, Didier L. Lootens, Eleonora Amici, Kevin P. Plucknett, William J. Frith. Effect of sucrose on agarose gels mechanical behaviour. *Carbohydrate Polymers* 2003;54:83-95.
- [52] Chen Q, Suki B, An KN. Dynamic mechanical properties of agarose gels modeled by a fractional derivative model. *J Biomech Eng.* 2004;126(5):666-71.
- [53] Christophe Helary, Isabelle Bataille, Aicha Abed, Corinne Illoul, Annie Anglo, Liliane Louedec, Didier Letourneur, Anne Meddahi-Pelle, Marie Madeleine Giraud-Guille. Concentrated collagen hydrogels as dermal substitutes. *Biomaterials* 2010;31:481-90.
- [54] Ming-Hong Chen, Pei-Ru Chen, Mei-Hsiu Chen, Sung-Tsang Hsieh, Jing-Shan Huang, Feng-Huei Lin. An in vivo study of tricalcium phosphate and glutaraldehyde crosslinking gelatin conduits in peripheral nerve repair. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials* 2005;77B(1):89-97.
- [55] Michael J. Moore et. al. Multiple-channel scaffolds to promote spinal cord axon regeneration. *Biomaterials* 2006;27:419-29.
- [56] Ayub K. Ommaya. Mechanical properties of tissues of the nervous system. *J. Biomechanics* 1968;1:127-38.
- [57] Rodney J. Fiford, Lynne E. Bilston. The mechanical properties of rat spinal cord in vitro. *J. Biomechanics* 2005;38:1509-15.

- [58] George P. Dillon, Xiaojun Yu, Anirudh Sridharan, John P Randieri, Raviv V. Bellamkonda. The influence of physical structure and charge on neurite extension in a 3D hydrogel scaffold. *J. Biomater. Sci. Polymer Edn* 1998;9:1049-69.
- [59] Alfonso Abizaid et. al. Ghrelin modulates the activity and synaptic input organization of midbrain dopamine neurons while promoting appetite. *J. Clinical Investigation* 2006;116:3229-39.
- [60] D. Michele Basso, Michael S. Beattie, Jacqueline C. Bresmahan. Graded histological and locomotor outcomes after spinal cord contusion using the NYU weight-drop device versus transection. *Experimental Neurology* 1996;139:244-56.
- [61] Sigrid Henke-Fahle, Karen Wild, Ana Sierra, Philippe P. Monnier. Characterization of a new brain-derived proteoglycan inhibiting retinal ganglion cell axon outgrowth. *Molecular and Cellular Neuroscience* 2001;18:541-56.
- [62] Philippe P. Monnier, Ana Sierra, Jan M. Schwab, Sigrid Henke-Fahle, and Bernhard K. Mueller. The Rho/ROCK pathway mediates neurite growth-inhibitory activity associated with the chondroitin sulfate proteoglycans of the CNS glial scar. *Molecular and Cellular Neuroscience* 2003;22:319-30.
- [63] Marco Curreli, Rui Zhang, Fumiaki N. Ishikawa, Hsiao-Kang Chang, Richard J. Cote, Chongwu Zhou, and Mark E. Thompson. Real-time, label-free detection of biological entities using nanowire-based FETs. *IEEE Trans. Nanotechnology* 2008;7:651-67.

- [64] Alexander Star, Eugene Tu, Joseph Niemann, Jean-Christophe P. Gabriel, C. Steve Joiner, Christian Valcke. Label-free detection of DNA hybridization using carbon nanotube network field-effect transistors. PNAS 2006;103:921-26.

## **ABSTRACT**

Due to spinal cord injury of central nervous system (CNS) lead to permanent loss of sensory and motor functions, many approaches to recover the functionality of spinal cord has been researched. Although the biocompatible scaffold or regenerative drugs has been explored and possibility of spinal cord regeneration is considered positively in the animal model, the effects were limited yet. Alternatively many neural interfaces for artificial prostheses are suggested. But the neural signal sensing from damaged spinal cord is still challenging problem.

In this study, the implantable neural device is suggested to record directly the neural signal from damaged spinal cord stump using regenerative method. In order to depress the negative effect of the inflammation on the neural signal acquisition, Ghrelin of which anti-inflammatory effect has been revealed recently is incorporated with the neural electrode devices in the form of integrated hydrogel scaffold. The in-vivo implantation experiment of the agarose scaffold with 10nM ghrelin shows statistically meaningful recovery of rat's locomotive function.

In addition, the implantable neural sensor is suggested for the injury level monitoring of spinal cord. The proposed sensor measures the CSPG (chondroitin sulfate proteoglycan) which is known as regeneration-inhibitive property and major composition of glial scar. The feasibility of the sensor is

verified by the in-vitro measurement of CSPG concentration with the range of 1~20 $\mu$ g/ml. The results show that the CSPG sensor can measure the inhibitive CPSG level.

The polyimide-based flexible neural device with six sieve-type electrodes for neural signal recording is fabricated using MEMS process. The electrochemical impedance of the fabricated device is measured using potentiostats. The measured result shows the low impedance of 17.9k $\Omega$  at 1kHz, which is sufficient to acquire properly neural electrical signal. The all electrodes on the devices are connected with the FPC connector on the specially designed interface board which can be fixed on the rat body firmly. The device-implanted rats were received standard post care and survived for 1 month.

In vivo neural signal sensing experiments is performed. The connector of the signal sensing machine is connected to the implanted neural electrodes of the rat under anesthesia. The sensory of the rat's lower body is stimulated by the soft brush to create compulsory neural signal. The electrical signal with the amplitude of 200~400 $\mu$ V is recorded using brush stimulation method. According to the frequency domain analysis, the peak frequency range is founded between 500Hz to 1kHz and neural signal from the stimulation is confirmed. The studied neural device is expected that it can be used for the artificial prostheses interface of the disabled with spinal cord injury.

**Keywords:** Spinal cord injury, neural prostheses, artificial interface, signal sensing

**Student Number:** 2007-30839