



동종신경이식 시 동결처리가 운동 기능 회복에 미치는 효과

최승식¹ · 박일용² · 현정근³ · 정재욱⁴ · 김종필⁴

단국대학교 의과대학 ¹운동의학과, ²의공학교실, ³재활의학교실, ⁴정형외과학교실

The Effect of Cryopreservation of Allograft Nerve on the Recovery of Motor Function

Seung-Sik Choi¹, Ilyong Park², Jung Keun Hyun³, Jae-Uk Jung⁴, Jong-Pil Kim⁴

Departments of ¹Kinesiology, ²Biomedical Engineering, ³Rehabilitation Medicine, and ⁴Orthopedic Surgery, Dankook University College of Medicine, Cheonan, Korea

Purpose: Peripheral nerve allograft can be an acceptable alternative, but it has not yet become clinically useful because of immune response to foreign tissue. With significant advances in the research and tissue engineering, various alternatives to nerve autograft including synthetic nerve conduit and decellularization have been used, but their therapeutic effects were not satisfactory. The purpose of this study was to confirm the effectiveness of cryopreservation of the allograft nerve as a useful nerve-graft substitute.

Methods: A total of 39 Sprague-Dawley rats (recipient) and 13 Lewis rats (donor) weighing 200 g to 300 g were used in this study. Animals were randomly divided 3 groups and received ipsilateral sciatic nerve graft: autograft (group 1), allograft (group 2), and cryopreserved nerve allograft (group 3). Nerve regeneration was evaluated at sixteen weeks on the basis of the animal weight, ankle contracture angle, compound muscle action potential, isometric tetanic muscle force, wet muscle weight of the tibialis anterior muscle, and the histomorphometry.

Results: Cryopreserved nerve allograft (group 3) showed superior motor recovery than allograft group (group 2), which was comparable to those of autograft (group 1).

Conclusion: Pretreatment of nerve allograft using cryopreservation decreased rejection caused by immune response of the donor and improved motor nerve recovery. In clinical perspective, use of a pretreated nerve allograft can be an alternative to the autograft.

Key Words: Nerve, Allograft, Autograft, Cryopreservation, Decellularization

서론

심한 연부 조직의 손상이나 신경 절단 손상 등으로 인해 발생하는 신경 결손은 심한 기능적 손실로 많은 환자들이

고통을 받고 있다. 1870년 자가 신경을 이용한 이식 수술이 처음으로 보고된 이후로 자가 신경을 이용한 이식 수술이 가장 표준적인 대안으로 여겨져 왔다¹. 하지만 자가 신경을 이용한 신경 재건술은 공여부의 부작용이 크고, 신경

Received July 25, 2019, Revised August 5, 2019, Accepted August 14, 2019

Corresponding author: Jong-Pil Kim

Department of Orthopedic Surgery, Dankook University College of Medicine, 119 Dandaero, Dongnam-gu, Cheonan 31116, Korea
TEL: +82-41-550-3919, FAX: +82-41-550-3094, E-mail: kimjp@dankook.ac.kr

Copyright © 2019 by Korean Society for Surgery of the Hand, Korean Society for Microsurgery, and Korean Society for Surgery of the Peripheral Nerve. All Rights reserved.
This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

결손 부위가 큰 경우 충분한 크기와 굵기의 자가 신경을 얻을 수 없다는 단점이 있다²⁻⁴.

생합성 신경 도관은 이러한 자가신경이식의 단점을 어느 정도 극복해 줄 수 있으리라 기대되어 많은 연구가 진행되었으며 현재 임상적으로 상용화되어 사용되고 있다^{1,3}. 하지만 대부분 1-2 cm 정도의 작은 결손 부위에 사용되고 있으며 그나마 감각 신경에 한정되어 사용되는 정도이고 운동 신경 재생 효과는 미미한 것으로 보고되고 있다⁴. 이러한 원인은 생합성 신경 도관이 생체 적합성이 떨어지고 신경 재생 과정 진행 중에 도관이 붕괴되어 충분한 구조적 안정성이 부족하고, 축색 성장 원뿔(axon growth cone)이 원위부 신경으로 정확하게 진행할 수 있도록 방향 지시와 같은 생체적 조건을 제공할 수 없을 뿐만 아니라, 손상된 신경 끝에서 신경 촉진 인자(nerve growth factor)의 분비를 유도하고 신경 도관의 생체적 환경을 유지시킬 수 있는 슈반세포(schwann cell)가 없기 때문인 것으로 판단된다⁵.

반면에 동종신경은 자가 신경과 같이 신경 내에 슈반세포가 존재하고 있어 축색이 자랄 수 있는 환경을 제공하고, 신경재생물질의 분비를 유도한다⁶. 또한 세포 외 기질(extracellular matrix)의 존재로 신경세포의 증식을 위한 지지체의 역할이 남아 있기 때문에 자가신경이식과 비슷한 정도의 재생 효과를 기대할 수 있어 자가신경이식을 대체할 이상적인 조직으로 각광 받고 있다^{7,8}. 하지만 동종신경이식의 가장 중요한 문제는 동종 조직에 대한 면역 반응(immune response)으로 공여체의 거부 반응으로 동종신경이식은 아직 적극적으로 치료에 사용되지 않고 있다.

동종신경에 대한 면역 반응을 줄이기 위해서 공여체를 동결보관 하는 방법^{9,10}, 미리 제작된 용액에 냉장 보관하는

방법⁴, 방사선을 사용하는 방법¹¹ 등의 다양한 방법들이 시도되고 있다. 이러한 방법들로 이식체에 대한 면역반응을 성공적으로 제거할 수 있다면 이식을 받은 부위의 회복 시간을 줄이는 것 뿐만 아니라 기능적으로 보다 우수한 축색 재생(axonal regeneration)을 가속화하고 최적화하는 데에 유리할 것이다¹²⁻¹⁴.

본 연구의 목적은 쥐 실험 모델을 사용하여 동종신경을 채취한 후 동결처리 방법으로 전처리하여 좌골 신경에 이식하여 족관절 구축 각도(ankle contracture angle), 복합 근육 활동 전위(compound muscle action potential, CMAP), 등척성 수축력 검사(isometric tetanic muscle force), 전경골근 무계, 신경 조직의 조직학적 분석(histomorphology)을 통하여 운동 신경 재생에 미치는 효과의 분석이다.

대상 및 방법

1. 실험대상

본 연구대상은 동물실험윤리위원회(Institutional Animal Care and Use Committee, IACUC)의 승인을 얻은 후 250-300 g 무게의 수컷 Sprague-Dawley 쥐를 수혜체(recipient)로 사용하였으며 수컷 Lewis 쥐를 공여체(donor)로 사용하였다. 두 종의 쥐 사이에는 가장 심한 major histocompatibility complex-mismatch가 있는 것으로 알려져 있다. 모두 3군의 실험군으로 제1군은 자가 신경이식군(대조군), 제2군은 동종신경이식군, 제3군은 동결처리된 동종신경이식군으로 설정하였다. Lewis 쥐는 각 군당 13마리로 무작위로 나누어 배분하여 총 39마리를 수혜쥐로 Sprague-Dawley 공여쥐는 모두 13마리가 사용되었다(Fig. 1).

2. 실험방법

1) 동종신경 전처리 과정

동종신경 전처리를 하기 위해서 Squintani 등⁹의 연구를 참고하여 진행하였다. 공여쥐로부터 적출한 15 mm 좌골 신경 감염을 방지하기 위해서 항생제를 섞은 생리식염수에 보관하였으며 이후 dimethyl sulfoxide (DMSO)를 포함한 L-glutamine (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), cryoprotectant (Sigma-Aldrich)와 2% of human albumin (Kedrion Biopharma, NewYork, NY, USA)로

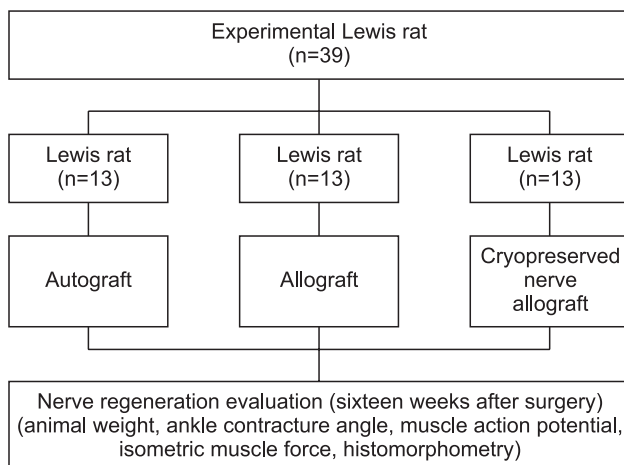


Fig. 1. Experimental procedure.

구성된 RPMI 1640에 10분 이상 보관 처리 후 -140°C 의 액화 질소에 급속 냉각하여 3개월간 보관하였다. DMSO는 물 분자와 연관된 세포에 빠르게 침투하고 세포의 손상과 세포벽의 역학적 응력의 원인이 되는 빙결정체를 막는 역할을 하며 이러한 매우 낮은 온도에서의 모든 생물학적 과정과 화학적 반응은 특히 세포 구조가 보존되는 기간을 지연되도록 한다.

동결처리된 동종신경은 이식 전에 실온 4°C 에 천천히 녹여 사용하였다.

2) 좌골신경 재건 수술 시기 및 술 후 관리

Isoflurane (Forane; Choongwae Pharma, Seoul, Korea)을 농도 50%, 질소와 산소의 비율 3:1을 유지하여 호흡 마취 실시하여 수술을 진행하였다. 수혜체의 대퇴부를 절개하여 좌골 신경을 노출하고 10 mm의 좌골 신경을 절제한 후 10-0 실(Ethilon 10-0; Ethicon, Somerville, NJ, USA)을 사용하여 자가 신경 및 3개월간 동결보관된 동종신경을 미세 현미경하에 이식 수술을 시행하였다. 이식 후 통증 치료를 위하여 0.1 mL/kg buprenorphine hydrochloride (Buprenex[®]; Hospira Inc., Lake Forest, IL, USA)를 피하 주사하고 감염 예방을 위해서 항생제(Tribrissen antibiotic; Coopers Agropharm Inc., Ajax, ON, Canada)를 투여하였다. 수술 후 전기 열선 패드로 보온 처리를 하고 통증 조절을 위해서 5일 동안 300 mg/kg of acetaminophen (Tylenol[™]; Janssen Pharmaceutica, Beerse, Belgium)을 식수에 타서 섭취하도록 하였다.

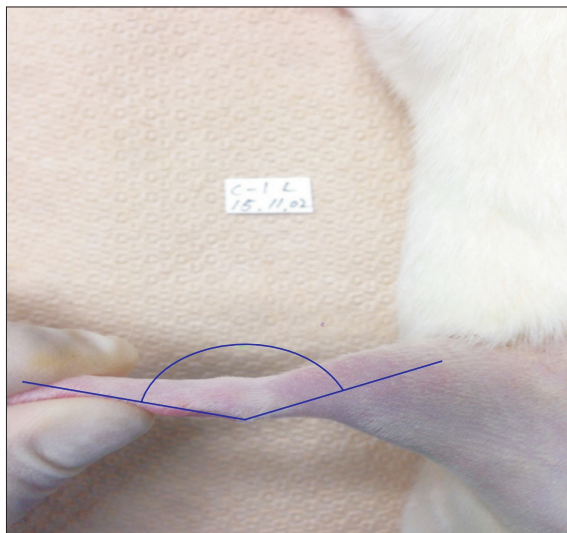


Fig. 2. Measurement of the ankle contracture angle.

수술 받은 쥐에게 물과 식량을 제한 없이 제공하였으며 적절한 온도(23°C - 25°C)와 습도(45%-50%)를 유지하여 Cage 당 한 마리씩 격리하여 관리하였다. 또한 수술한 부위에 붓기가 있는지, 수술한 부위를 물어뜯거나 먹는 비정상적인 행동이 있는지, 물과 양분은 잘 먹는지, 수시로 관찰하며 매주 한 번씩 몸무게 변화를 확인하였다.

모든 군은 수술 후 16주 후에 희생수기를 통하여 몸무게 측정, 족관절 구축, CMAP, 등척성 수축력 검사를 실시하고 조직학적 분석을 하기 위해서 비골신경, 좌골신경, 전경골근을 적출한 후 희생하였으며 모든 검사와 조직 적출은 수술한 다리와 수술하지 않은 다리에 동일하게 적용하여 실시하였다(Fig. 1).

3) 운동 신경 회복 평가

(1) 쥐 무게(weight) 변화량 및 족관절 구축 측정

수술하기 전의 무게와 16주 후 희생할 때의 무게 변화량(weight gain)을 비교하였으며 족관절 구축 각도는 이식부와 반대측의 족관절 관절각을 측정하여 족관절 구축 후 회복 정도를 비교하였다(Fig. 2).

(2) 복합 근육 활동 전위(compound muscle action potential)

검사를 진행하기 위하여 말초신경의 근위부에 일정 값의 자극을 준 후 이 신경이 지배하는 원위부 근육에서 발생하는 CMAP를 기록하는 것으로 최대 진폭을 측정하여 비교하였다.

CMAP의 전 과정은 쥐의 체온 저하를 막기 위해 전자식 가열 패드에 올려놓은 상태에서 Isoflurane (Forane)

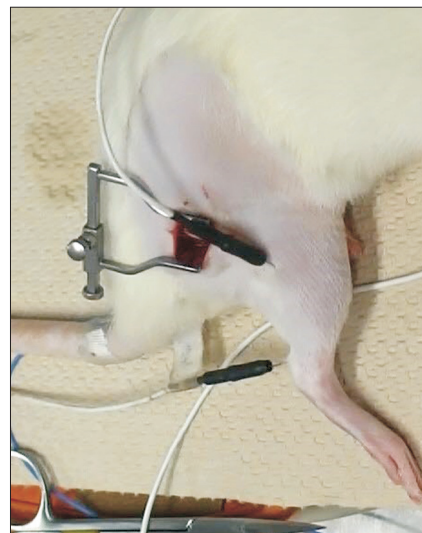


Fig. 3. Compound muscle action pot.

의 농도 20%, 질소와 산소의 비율을 3:1로 유지하여 호흡마취하에 진행하였다. 수술하였던 부위의 좌골신경을 완전히 드러내기 위해서 이상근이 있는 지점에서부터 경골신경가지와 비골신경가지가 나누어지는 지점에서의 원위부 5 mm 지점까지 더 확장하여 피부를 절개하였다. 바늘로 된 reference 전극을 아킬레스건에, active 전극을 비복근의 가장 볼록한 부분에 삽입한 후 접지 전극으로 된 ground 전극을 꼬리에 부착하였다. 전기 자극은 좌골 신경의 수술 부위의 근위부에 전기 자극기로 1 ms의 자극 시간, 1 Hz의 주기, 5 mA의 자극을 주어 신호를 PC로 전달하며 Bio-amplifier (Bio Amp; AD Instruments Inc., Colorado Springs, CO, USA)를 사용하여 신호를 증폭시키고 이 값을 Labchart 7 software (Labchart 7, AD Instruments Inc.)를 사용하여 분석하였다(Fig. 3).

(3) 최대 등척성 수축력 검사(maximal isometric tetanic muscle force)

최대 등척성 수축력 검사는 Shin 등¹³의 방법을 참고하여 CMAP 검사를 마친 후 시작하며 전 과정은 쥐의 체온 저하를 막기 위해 전자식 가열 패드에 올려놓은 상태에서 Isoflurane (Forane)의 농도 50%, 질소와 산소의 비율을 3:1로 유지하여 호흡마취하에 진행하였다. 소형의 양극 전기 자극기(Havard Apparatus, Holliston, MA, USA)를 접지하기 위해서 CMAP 검사를 진행하기 위해 드러낸 피부를 전경골근이 부착된 발의 안쪽까지 절개한 후 좌골신경을 따라 연결된 비골신경을 비골신경가지와 경골신경가지가 갈라지는 분지로부터 약 10 mm 원위부까지 조심스럽게 절개하였다. 그 다음 전경골근이 완전히 드러날 수 있도록 피부와 막을 절개하고 건을 흰으로 절단한 후 건에 4-0 실(4-0 Ethilon; Ethicon)로 뜯어지지 않도록 촘촘하게 묶었다. 랫을 특별히 고안된 등척성 수축력 검사대 위에 올

려놓고 하면 판에 슬관절과 족관절을 90도로 고정, force transducer (FS05; Inelta Inc., München, Germany)와 전경골근 건을 포셉으로 연결하여 수평을 이루도록 고정하였다. 이 장비에 연결된 PC의 LabVIEW software (National Instruments, Austin, TX, USA)를 사용하여 근 긴장 정도를 25 g에서 45 g까지 5 g 간격으로 0.4 ms duration과 2 V의 자극을 주며 가장 적절한 근 긴장을 찾았고 이 상태에서 최대 수축력에 대한 값을 얻었다. 실제적인 등척성 수축력 실험에서는 0.4 ms duration과 10 V의 자극을 동일하게 적용하였고 frequency를 120-200 Hz의 범위 내에서 10 Hz 간격으로 각각 자극을 주어 최대 수축력에 대한 값을 얻었다(Fig. 4).

(4) 전경골근의 무게 측정(tibial anterior muscle weight)

족관절 구축, 전리생리검사와 최대 등척성 수축력 검사를 종료한 후 고농도의 phenobarbital로 안락사 시키고 양측의 전 경골근을 채취하여 미세 전자저울을 사용하여 무게를 측정하였다. 각 군의 비교는 수술 받은 부위에 대하여 수술한 부위의 전경골근의 무게의 비율을 산정하여 비교하였다(Fig. 5).

(5) 조직학적 분석(histomorphometry)

조직형태계측을 하기 위해서 Giusti 등¹⁴의 방법을 사용하였으며 반대쪽과 같이 신경 접합부 원위부에서 2 mm의 비골 신경을 채취하여 2.5% Glutaraldehyde (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA, USA)에 4°C를 유지하여 2시간 이상 고정하였다. 전고정 후 모든 과정은 안전을 위하여 hood에서 실시하였다. Phosphate buffer solution으로 10분 동안 수세한 후 다시 1% OsO₄에 60-70분 동안 담가 놓는 후고정의 과정을 거쳤다. 이때, 1% OsO₄는 1 g OsO₄ crystal ampule을 물에 담귀 label을 벗겼다. 그 후 아세톤이나 알코올로 씻어내고

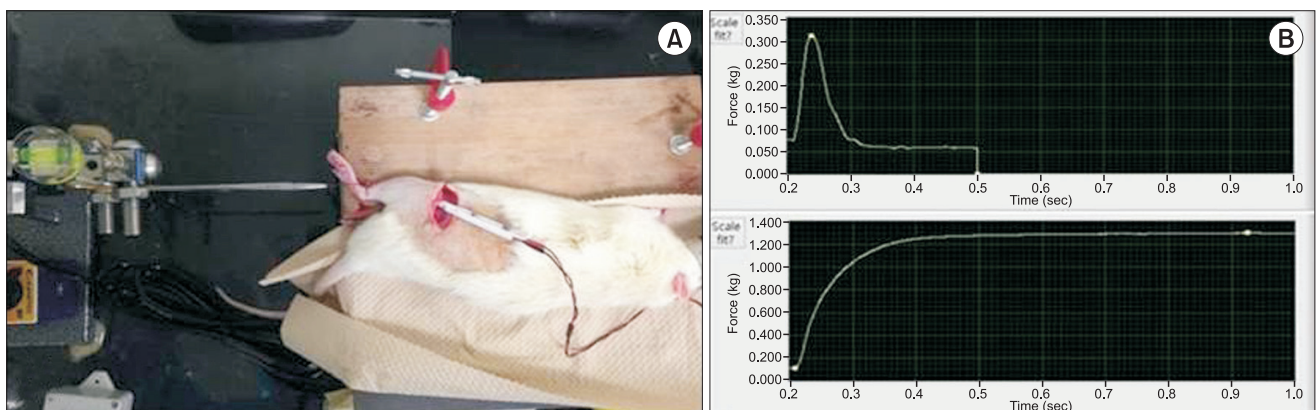


Fig. 4. (A) Isometric tetanic muscle force. (B) Data output from LabVIEW.



Fig. 5. Tibialis anterior muscle of nonoperative side (superior), operative side (inferior).

ampule cutter로 금을 낸 후 D.W로 깨끗하게 세척을 하였다. 마지막으로 갈색병에 ampule을 넣고 D.W 50 mL를 채운 후 나무 막대나 OsO_4 용 포셉을 사용해서 ampule에 있는 결정을 모두 녹였다. 이 역시 고정액은 눈, 코의 점막, 기도 등에 심한 손상을 주기 때문에 전 과정을 hood에서 진행하였다. 후고정이 끝나고 다시 phosphate buffer solution으로 10분 동안 수세하였고 70%, 80%, 90%, 95%, 100%, 100% (fresh) 알콜에 각각 10분씩 탈수 과정을 거쳤다. 탈수를 마치면 propylene oxide에 10분씩 2회 치환 과정에서 propylene oxide의 낮은 기화점으로 인하여 vial의 마개를 열어 놓고 실시하였다. 치환 후 포매 시 사용하는 epon 용액은 epon812:DDSA:MNA:DMP-30=10:8:4:0.33-0.44의 비율로 제조하여 사용하며 남은 용액은 4°C에 냉장 보관하였다. 치환이 끝난 즉시 propylene oxide (Electron Microscopy Sciences):epon (Embed 812 resin; Electron Microscopy Sciences); 1:1의 비율로 1시간 동안 rotator에 돌려 놓고, 시간이 지난 후 1:2의 비율로 2시간, 마지막으로 fresh epon (Embed 812 resin)에 담가 놓고 18시간이 흐른 뒤에 plate mold를 사용하여 조직을 세로 방향으로 놓고 80°C oven에서 24시간 동안 경화시켰다. 완전히 경화된 블록을 ultramicrotome (Reichert Ultracut E; Leica, Deerfield, IL, USA)에 고정 후 제작된 유리칼로 0.3 μm 의 두께로 절단하여 적절한 온도와 농도를 맞추어 가며 toluidine blue (Toluidine blue O; Electron Microscopy Sciences) 염색을 진행하였다. 염색이 완료

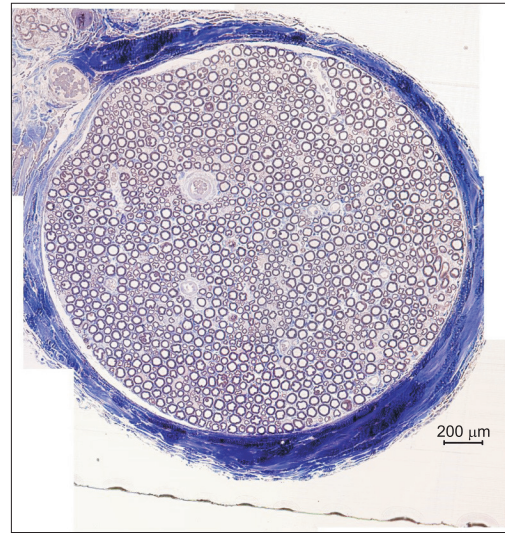


Fig. 6. Toluidine blue stain.

된 조직은 광학현미경을 사용하여 400 배율로 tile scan을 하고 이 이미지를 I-solution (IMT I-Solution 21.1; IMT I-Solution Inc., Vancouver, BC, Canada)을 사용하여 축색의 개수, 축색의 면적, myelin 면적, 전체 신경 면적 (total nerve area), N ratio, 및 신경 밀도(nerve fiber density)를 측정하여 분석하였다(Fig. 6).

결과

1. 무게(animal weight)

수술 후 16주 동안 총 무게의 증가량은 1군에서 $139.55\% \pm 7.11\%$, 2군에서 $133.55\% \pm 7.43\%$, 3군에서 $162.03\% \pm 19.58\%$ 로 3군에 가장 높게 측정되었다($p < 0.05$; Table 1).

2. 족관절 구축

수술하지 않은 부위에 대한 수술한 부위의 족저굴곡 각의 그룹 간 비교에서는 1군에서 $89.05\% \pm 4.68\%$, 2군에서 $82.63\% \pm 7.66\%$, 3군에서 $91.65\% \pm 14.26\%$ 로 3군의 족저각 회복률이 높았으나 각 군의 통계적 차이는 없었다($p = 0.068$; Fig. 7).

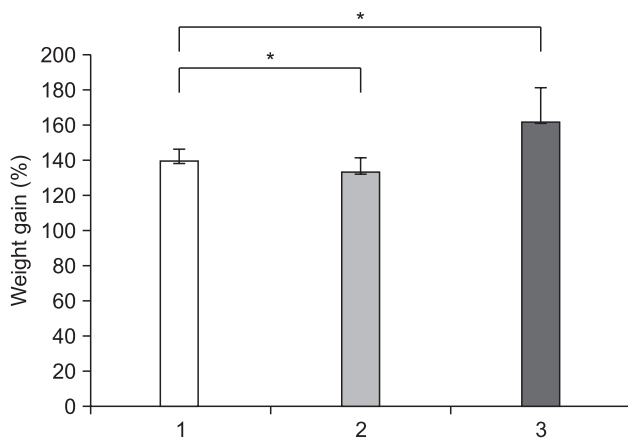
3. 복합 근육 활동 전위

수술하지 않은 부위에 대한 수술한 부위의 CMAP 값의 그룹 간 비교에서는 1군에서 $56.92\% \pm 12.46\%$, 2군에

Table 1. Recovery of motor function

	Group 1	Group 2	Group 3	p-value
Sample	13	13	13	
Weight gain (%)	139.55±7.11	133.55±7.43	162.03±19.58	<0.001
Ankle angle (%)	89.05±4.68	82.63±7.66	91.65±14.26	<0.048
CMAP (%)	56.92±12.46	33.68±12.91	53.59±10.15	<0.001
Force (%)	60.17±5.68	40.77±7.17	60.37±6.68	<0.001
Muscle weight (%)	58.43±7.49	57.50±4.91	62.34±9.11	<0.001

Values are presented as number only or mean±standard deviation. Group 1: autograft, group 2: allograft, group 3: cryopreserved nerve allograft.

**Fig. 7.** Comparison of weight gain (%). *p<0.05.

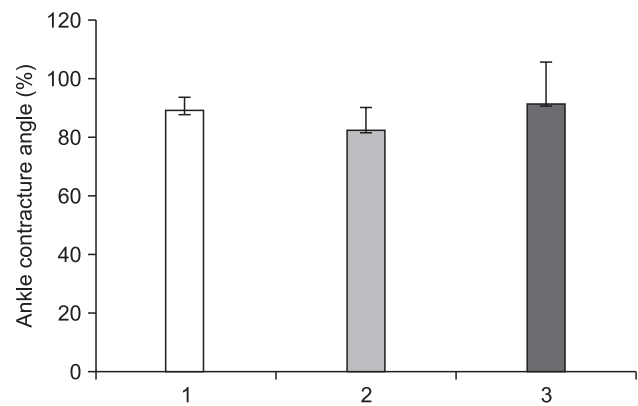
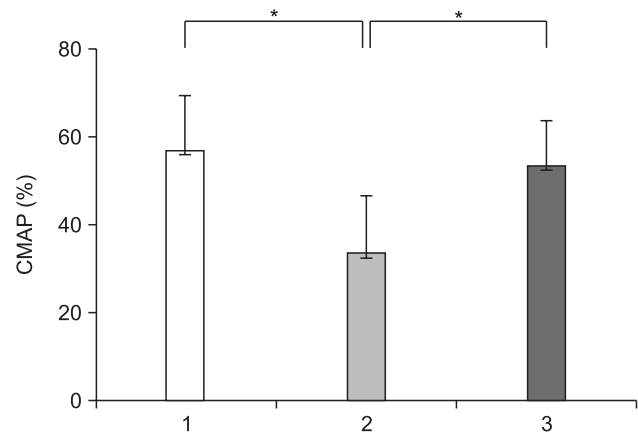
서 33.68%±12.91% 및 3군에서 53.59%±10.15%로 2군에서 가장 낮았으며 통계적으로 유의하였다(p=0.001). 제1군과 3군 사이의 차이는 통계적으로 유의하지 않았다(p=0.778; Fig. 8).

4. 최대 등척성 수축력 검사

수술하지 않은 부위에 대한 수술한 부위의 최대 등척성 수축력 검사 값의 그룹 간 비교에서는 1군에서 60.17%±5.68%, 2군에서 40.77%±7.17%, 3군에서 60.37%±6.68%로 2군에서 가장 낮았으며 통계적으로 유의하였으나(p<0.001), 제1군과 3군 사이의 통계적 차이는 없었다(p=0.997; Fig. 9).

5. 전경골근의 무게(weight of tibialis anterior muscle)

이식 받은 쪽의 전경근의 무게는 반대쪽에 비하여 1군

**Fig. 8.** Comparison of the recovery rate of the ankle contracture angle compared to nonoperative side.**Fig. 9.** Comparison of the rate of compound muscle action potential (CMAP) compared to nonoperative side. *p<0.05.

에서 58.43%±7.49%, 2군에서 57.50%±4.91%, 3군에서 62.34%±9.11%로 측정되었으며 제2군에서 낮았으며 통계적으로는 제2군과 3군 사이에 유의한 차이를 보였다(p=0.001; Fig. 10).

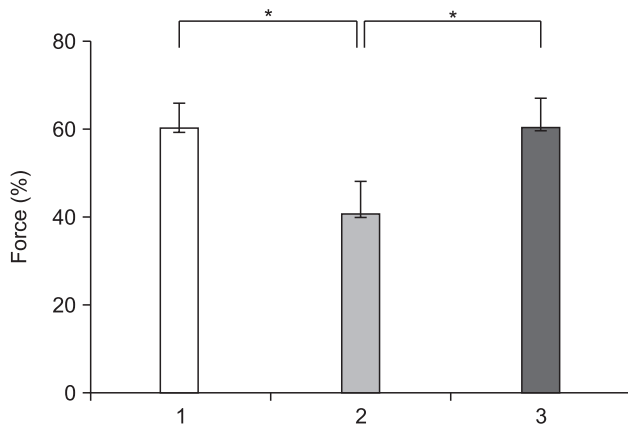


Fig. 10. Comparison of the rate of isometric tetanic muscle force compared to nonoperative side. * $p<0.05$.

6. 조직학적 분석

조직학적 분석 역시 수술하지 않은 부위에 대한 수술한 부위의 값을 백분율로 나타내어 비교하였다(Fig. 11, Table 2). 신경 전체의 단면적 넓이를 측정한 값은 반대쪽에 비하여 평균 86% (84.1%-88.9%)로 각 군 사이의 통계적으로 유의한 차이는 없었다($p<0.006$). 축색의 총 개수는 반대쪽에 비하여 19%에서 23% 많았으며 세 군 모두 비슷하게 측정되었다($p<0.968$).

축색의 총 단면적을 측정한 결과 1군에서 $26.81\pm 10.48\%$, 2군에서 $26.31\pm 13.49\%$ 및 3군에서 $45.57\pm 13.77\%$ 로 3군에서 통계적으로 유의하게 높았다($p<0.05$). 수초의 총 단면적을 측정한 값은 1군과 3군에

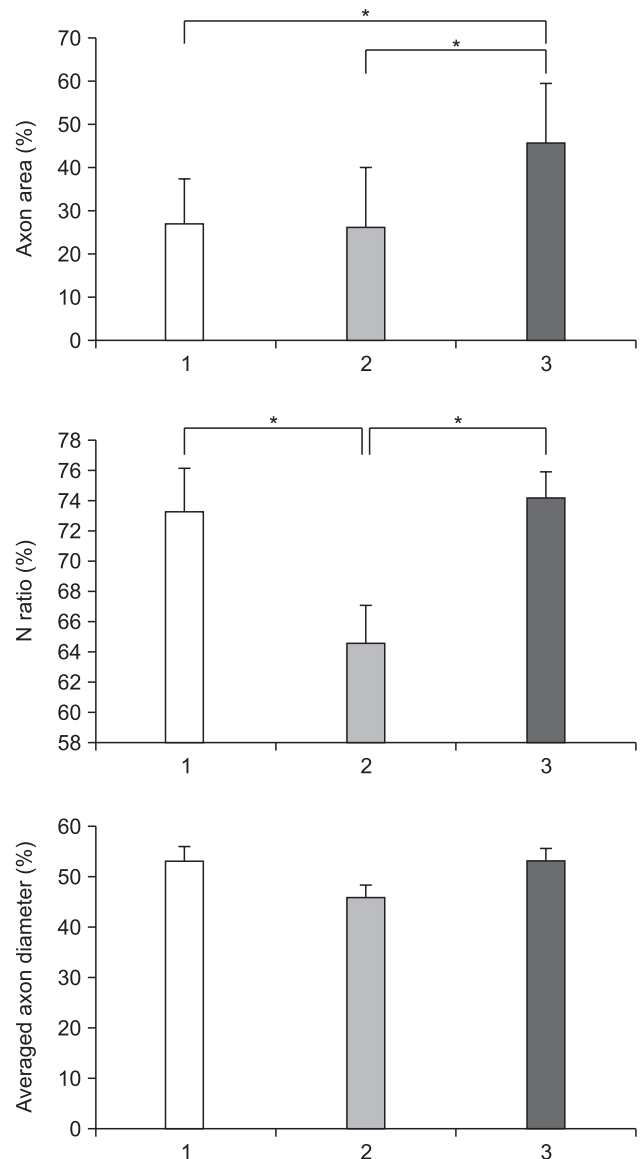
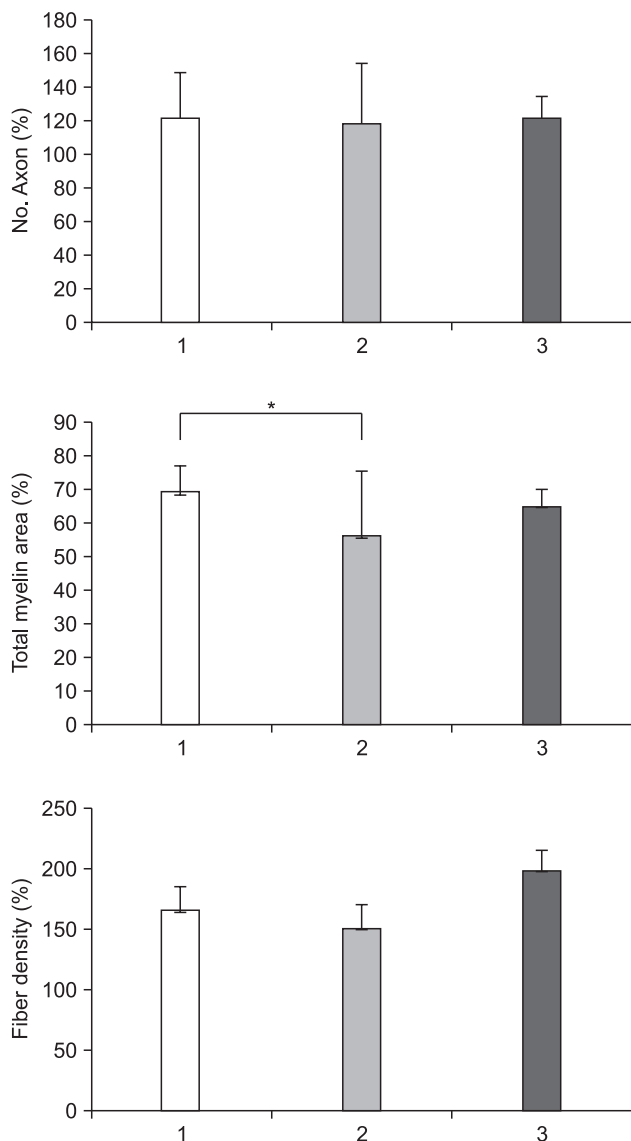
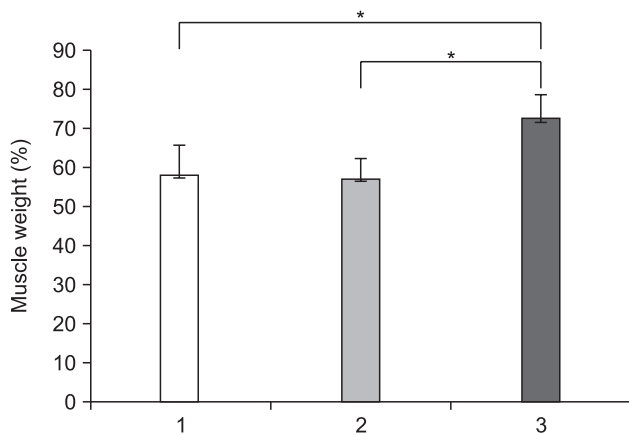


Fig. 11. Comparison of the histomorphometry. * $p<0.05$.

Table 2. Results from histomorphometric analysis of the peroneal nerve

	Group 1	Group 2	Group 3	p-value
Sample	13	13	13	
Total nerve area (%)	84.07±31.05	86.76±28.23	88.90±13.95	<0.906
No. axon (%)	121.17±26.82	118.91±35.12	121.58±12.58	<0.968
Axon area (%)	26.81±10.48	26.31±13.49	45.57±13.77	<0.001
Total myelin area (%)	69.22±7.70	56.07±18.94	64.93±4.85	0.048
N ratio (%)	73.30±9.52	64.62±8.39	74.24±5.41	<0.015
Fiber density (%)	164.96±69.64	150.93±63.97	198.83±54.07	<0.202
Fiber diameter (%)	53.24±9.74	46.19±7.56	51.54±8.83	<0.095

Values are presented as number only or mean±standard deviation. Group 1: autograft, group 2: allograft, group 3: cryopreserved nerve allograft.

**Fig. 12.** Comparison of the rate of the tibialis anterior muscle weight compared to nonoperative side. *p<0.05.

서 각각 69.22%±7.70% 및 64.93%±4.85%로 2군의 56.07%±18.94%보다 컸으나 통계적으로는 제1군과 2군 사이에 유의한 차이가 있었다(p=0.042). N ratio는 1군에서 73.30%±9.52%, 3군에서 74.24%±5.41%로 측정되어 모두 2군의 64.62%±8.39%보다 높았다(p<0.05). 축색의 밀도는 모든 군에서 통계적으로 유의한 차이를 보이지 않았다(p=0.202). 축색의 평균 직경은 제1군에서 53.24%±9.74%, 2군에서 46.19%±7.56% 및 3군에서 51.54%±8.83%로 측정되었으며 세 군 사이의 통계적으로 유의한 차이는 없었다(p=0.095; Fig. 12)

고찰

동종신경은 축색이 자랄 수 있는 환경을 제공하고, 신경 재생물질의 분비를 유도할 뿐만 아니라 신경과 비슷한 재생 효과를 기대할 수 있다⁶⁻⁸. 하지만 동종신경을 이식체로 사용 시 가장 중요한 문제는 공여체의 거부 반응이다. 현재

까지 동종신경에 대한 면역 반응을 줄이기 위해서 공여체를 동결보관 하는 방법^{9,10}, 미리 제작된 용액에 냉장 보관 하는 방법⁴, 방사선을 사용하는 방법¹¹ 등의 다양한 방법들이 시도되고 있고 이러한 방법들로 이식 시 생기는 문제를 개선할 수 있을 것으로 기대할 수 있다¹³⁻¹⁶.

기존 연구에서는 동종신경을 동결처리 기법으로 전처리 과정을 거친 후 신경 결손 재건 시 자가 신경 대체물로 사용하여 비교적 만족할 만한 결과를 보고 한 바 있다^{9,10}. Evans 등¹⁰은 동종신경의 동결처리는 면역 반응과 이식 거부 반응이 감소할 수 있다고 하였으며 이 기술은 말초 신경을 재건하는 데 있어 이식 재료로 사용되는 것에 거의 제한 받지 않고 공여체를 아주 긴 시간 동안 저장할 수 있다는 장점이 있다고 하였다. 실제로 동종신경을 4°C로 3주 이상 보관 하면 면역 반응을 일으키는 IFN- γ 과 IL-4를 감소시키고 정상 신경보다는 적지만 어느 정도의 슈만세포가 보존되고 또한 상당량의 정상 세포도 유지한 채로 신경이 이식이 가능하다고 보고되고 있다¹⁷. Hare 등¹⁸의 연구에서는 긴 기간 동안 냉장 보관한 동종신경을 이식했을 때 림프구의 침윤 현상이 줄어들었으며 아무런 처리를 하지 않은 동종신경 이식에서 나타나는 림프구 생산을 막거나 지연시키는 결과를 보였다. 다른 기존 연구 결과에서는 동종신경을 7주 동안 냉장 보관했을 때 세포접합을 필요로 하는 대부분의 면역반응에 관여하는 것으로 알려져 있는 세포 간 부착 분자-1 (intercellular adhesion molecule-1, ICAM-1)의 발현량과 이식 시 가장 강한 거부반응을 일으키는 동종항원군과 이를 지배하는 유전자군인 주조직적합복합체 (major histocompatibility complex)-2의 항원이 줄어들었다^{10,19}. 또한 신경의 동결처리는 슈만세포의 생존성을 보존하고 기저판(basal lamina)을 유지할 수 있어 효율적인 축색의 재생을 기대할 수 있다²⁰⁻²³. 이러한 냉동 또는 냉장 처리 기술은 또한 외부 조직에 대한 면역적 인식의 가장

근본적인 원인인 인체의 백혈구 항원(human leukocyte antigens)과 ICAM-1의 발현을 감소시켜 면역 반응을 줄일 수 있다^{10,19,24}. 본 연구에서도 냉동 처리된 동종신경이식 후 운동 신경 재생의 효과가 자가 신경과 비슷한 정도로 우수하였던 것을 근거로 볼 때 면역 반응에 의한 이식체의 거부 반응을 줄이는 데 효과적이었던 것으로 생각된다. 따라서 본 연구를 통하여 사체에서 적출한 동종신경의 냉장 또는 냉동 보관 처리 후 어떠한 면역억제제 없이도 손상된 말초신경의 기능을 회복하는 데 다양한 수술적 전략이 될 수 있을 것이다.

동종신경의 전처리 과정이 동종신경의 효과에 대한 중요한 부분인데 본 연구에서는 Squintani 등⁹의 연구에서 시행하였던 방법으로 전처리 과정을 거쳤으며 DMSO를 이용하여 전처리를 거쳤던 Fansa 등²⁵의 연구 또한 우수한 연구 결과를 보고하였다. Mackinnon 등²은 저온 처리하여 7일간 보존 후 이식한 동종신경의 우수한 면역억제와 신경 재생 효과를 보고한 반면 Sguintani 등⁹은 평균 9개월 동결처리 후 이식한 동종신경의 임상적 결과가 우수하다고 보고한 바 있다. 본 연구에서는 동결처리 후 보존 기간을 3개월로 하여 비교적 우수한 신경 재생 효과를 보였다고 판단되나 향후 동결처리 후 보존 기간에 대한 추가적인 연구가 더 필요할 것으로 생각된다. 동결처리된 동종신경이식 외에도 화학처리(chemical process)를 통한 세포 제거술(decellularization)이 활발히 연구되어 실제 임상적으로도 쓰여지고 있으나 아직까지는 어떤 방법이 효율적으로 면역반응을 억제하며 신경재생을 도모할 수 있는지에 대한 비교 연구가 진행되지 않았다²⁶⁻²⁸.

슈반세포는 신경의 기저판을 형성하고 어느 정도의 신경 영양 인자들을 생성함으로써 축삭의 재생을 돕는 데 매우 중요한 역할을 하지만 모든 세포와 같이 슈반세포의 생존력은 동결 정도에 따라 달라진다^{7,25,29}. Fansa 등²⁵은 DMSO를 사용하여 동결처리를 한 동종신경으로 수술한 후 6주 동안 매우 우수한 축삭 재생을 보였다고 보고하였다. 이 연구에서 6주 동안 동결처리를 한 결과, 슈반세포의 기저판과 신경외막이 대체적으로 손상 없이 온전하였음을 나타냈다. 이와 비슷하게 저자들의 연구에서는 수술 이후 16주 동안 자가신경이식을 받은 군과 동결처리를 받은 동종신경이식 군에서 신경 재생의 조직학적인 차이는 없었다.

본 연구는 다음과 같은 제한점이 있다. 첫째, 감각 신경을 배제한 운동 신경 회복만을 평가한 것으로 전반적인 신경 회복에 대한 연구가 필요할 것이다. 둘째, 실험 쥐에서 나타난 실험 결과를 인간에게 곧 바로 적용하는 데에 한계

가 있다. 셋째, 각 군 간 실험 대상군이 13마리로 각 군의 특성을 충분히 반영하지 못할 수 있다. 마지막으로, 이식 부위 원위부 신경의 조직검사, 운동 신경 회복 정도의 측정을 통하여 간접적으로 이식 거부 정도 또는 그 발생 여부를 측정하는 것으로 이식 신경을 직접 관찰, 채취 후 조직 검사를 시행하여 이식 거부 반응의 유무 및 그 정도를 직접 측정하는 것에 비해 실제 이식 거부의 발생률을 비교하지 못했다.

이러한 제한점에도 불구하고 동결처리 기술로 전처리한 동종신경이식의 결과를 분석한 본 연구는 운동 신경의 기능적 회복을 나타내는 족관절 구축 각도, CMAP, 최대 등척성 수축력, 전경골근의 무게 및 조직학적 소견을 포함한 모든 측정에서 동결처리를 한 동종신경이식군의 회복이 자가신경이식의 회복과 유사하다는 결과를 증명하였다. 이러한 결과에 기초해서 동결처리를 활용한 이식의 축삭 재생은 조직학적으로, 임상적으로 유용하며 이것은 동결처리를 거친 동종신경이식이 어떤 면역억제제를 투여하지 않아도 자가신경이식의 대안이 될 수 있다는 것으로 생각된다.

결론

본 연구 결과는 동결처리 과정을 거친 동종신경이 말초 신경 결함의 재건에 있어 효과적인 대안이 될 수 있다는 것을 보여준다. 실험 쥐를 사용한 연구 자료에 기초하여 사체에서 적출한 동종신경을 동결처리하여 사용하는 것은 면역억제제를 사용하지 않고도 말초 신경 손상의 운동 기능을 회복하는 데 유효한 수술적 전략이 될 수 있다.

CONFLICTS OF INTEREST

The authors have nothing to disclose.

REFERENCES

1. Griffin JW, Hogan MV, Chhabra AB, Deal DN. Peripheral nerve repair and reconstruction. *J Bone Joint Surg Am*. 2013;95:2144-51.
2. Mackinnon SE, Doolabh VB, Novak CB, Trulock EP. Clinical outcome following nerve allograft transplantation. *Plast Reconstr Surg*. 2001;107:1419-29.
3. Sahakyants T, Lee JY, Friedrich PF, Bishop AT, Shin AY. Return of motor function after repair of a 3-cm gap in a

- rabbit peroneal nerve: a comparison of autograft, collagen conduit, and conduit filled with collagen-GAG matrix. *J Bone Joint Surg Am.* 2013;95:1952-8.
4. Isaacs J, Browne T. Overcoming short gaps in peripheral nerve repair: conduits and human acellular nerve allograft. *Hand (N Y).* 2014;9:131-7.
 5. Moore AM, Ray WZ, Chenard KE, Tung T, Mackinnon SE. Nerve allotransplantation as it pertains to composite tissue transplantation. *Hand (N Y).* 2009;4:239-44.
 6. Zhong H, Chen B, Lu S, Zhao M, Guo Y, Hou S. Nerve regeneration and functional recovery after a sciatic nerve gap is repaired by an acellular nerve allograft made through chemical extraction in canines. *J Reconstr Microsurg.* 2007;23:479-87.
 7. Rinker B, Vyas KS. Clinical applications of autografts, conduits, and allografts in repair of nerve defects in the hand: current guidelines. *Clin Plast Surg.* 2014;41:533-50.
 8. Karabekmez FE, Duymaz A, Moran SL. Early clinical outcomes with the use of decellularized nerve allograft for repair of sensory defects within the hand. *Hand (N Y).* 2009;4:245-9.
 9. Squintani G, Bonetti B, Paolin A, et al. Nerve regeneration across cryopreserved allografts from cadaveric donors: a novel approach for peripheral nerve reconstruction. *J Neurosurg.* 2013;119:907-13.
 10. Evans PJ, Mackinnon SE, Levi AD, et al. Cold preserved nerve allografts: changes in basement membrane, viability, immunogenicity, and regeneration. *Muscle Nerve.* 1998;21:1507-22.
 11. Marmor L. The repair of peripheral nerves by irradiated homografts. *Clin Orthop Relat Res.* 1964;34:161-9.
 12. Wang MS, Zeleny-Pooley M, Gold BG. Comparative dose-dependence study of FK506 and cyclosporin A on the rate of axonal regeneration in the rat sciatic nerve. *J Pharmacol Exp Ther.* 1997;282:1084-93.
 13. Shin RH, Friedrich PF, Crum BA, Bishop AT, Shin AY. Treatment of a segmental nerve defect in the rat with use of bioabsorbable synthetic nerve conduits: a comparison of commercially available conduits. *J Bone Joint Surg Am.* 2009;91:2194-204.
 14. Giusti G, Willems WF, Kremer T, Friedrich PF, Bishop AT, Shin AY. Return of motor function after segmental nerve loss in a rat model: comparison of autogenous nerve graft, collagen conduit, and processed allograft (AxoGen). *J Bone Joint Surg Am.* 2012;94:410-7.
 15. Brenner MJ, Lowe JB 3rd, Fox IK, et al. Effects of Schwann cells and donor antigen on long-nerve allograft regeneration. *Microsurgery.* 2005;25:61-70.
 16. Zalewski AA, Azzam NA, Azzam RN. The loss of regenerated host axons in nerve allografts after stopping immunosuppression with cyclosporin A is related to immune effects on allogeneic Schwann cells. *Exp Neurol.* 1995;133:189-97.
 17. Levi AD, Evans PJ, Mackinnon SE, Bunge RP. Cold storage of peripheral nerves: an in vitro assay of cell viability and function. *Glia.* 1994;10:121-31.
 18. Hare GM, Evans PJ, Mackinnon SE, Wade JA, Young AJ, Hay JB. Phenotypic analysis of migrant, efferent lymphocytes after implantation of cold preserved, peripheral nerve allografts. *J Neuroimmunol.* 1995;56:9-16.
 19. Atchabahian A, Mackinnon SE, Hunter DA. Cold preservation of nerve grafts decreases expression of ICAM-1 and class II MHC antigens. *J Reconstr Microsurg.* 1999;15:307-11.
 20. Rustemeyer J, Dicke U. Allografting combined with systemic FK506 produces greater functional recovery than conduit implantation in a rat model of sciatic nerve injury. *J Reconstr Microsurg.* 2010;26:123-9.
 21. Doolabh VB, Mackinnon SE. FK506 accelerates functional recovery following nerve grafting in a rat model. *Plast Reconstr Surg.* 1999;103:1928-36.
 22. Fansa H, Keilhoff G, Altmann S, Plogmeier K, Wolf G, Schneider W. The effect of the immunosuppressant FK 506 on peripheral nerve regeneration following nerve grafting. *J Hand Surg Br.* 1999;24:38-42.
 23. Udina E, Gold BG, Navarro X. Comparison of continuous and discontinuous FK506 administration on autograft or allograft repair of sciatic nerve resection. *Muscle Nerve.* 2004;29:812-22.
 24. Fox IK, Jaramillo A, Hunter DA, Rickman SR, Mohanakumar T, Mackinnon SE. Prolonged cold-preservation of nerve allografts. *Muscle Nerve.* 2005;31:59-69.
 25. Fansa H, Lassner F, Kook PH, Keilhoff G, Schneider W. Cryopreservation of peripheral nerve grafts. *Muscle Nerve.* 2000;23:1227-33.
 26. Hundepool CA, Nijhuis TH, Kotsougiani D, Friedrich PF,

- Bishop AT, Shin AY. Optimizing decellularization techniques to create a new nerve allograft: an in vitro study using rodent nerve segments. *Neurosurg Focus*. 2017;42:E4.
27. Deslivia MF, Lee HJ, Adikrishna A, Jeon IH. Decellularized nerves for upper limb nerve reconstruction: a systematic review of functional outcomes. *J Reconstr Microsurg*. 2015;31:660-7.
28. Sridharan R, Reilly RB, Buckley CT. Decellularized grafts with axially aligned channels for peripheral nerve regeneration. *J Mech Behav Biomed Mater*. 2015;41:124-35.
29. Houschyar KS, Momeni A, Pyles MN, et al. The role of current techniques and concepts in peripheral nerve repair. *Plast Surg Int*. 2016;2016:4175293.

동종신경이식 시 동결처리가 운동 기능 회복에 미치는 효과

최승식¹ · 박일용² · 현정근³ · 정재욱⁴ · 김종필⁴

단국대학교 의과대학 ¹운동의학과, ²의공학교실, ³재활의학교실, ⁴정형외과학교실

목적: 동종신경은 효율적인 자가 신경의 대체 조직체가 될 수 있으나 수혜체의 거부 반응으로 인하여 임상적 사용이 제한되고 있다. 현재까지 다양한 조직 공학적 방법과 생합성 신경도관이 소개되고 있으나 아직 자가 신경을 대체할 이상적인 이식체는 없다. 본 연구는 쥐 실험 모델을 통하여 동종신경에 대한 동결처리가 신경 이식 후 운동 회복에 미치는 효과를 분석하고 효율적인 동종신경이식 방법으로 제시될 수 있는지 분석하고자 한다.

방법: 총 39마리의 Lewis 쥐(공여체)와 13마리 Sprague-Dawley 쥐(수혜체)를 사용하였으며 모두 200-300 g의 수컷 쥐였다. 수혜체 쥐를 무작위로 세 군(자가신경이식-1군, 동종신경이식-2군 및 동결처리된 동종신경이식-3군)으로 나누어 일측성 좌골신경이식을 시행하였다. 신경 재생에 대한 효과는 신경이식수술 후 16주 뒤에 희생수기를 통하여 체중, 족관절 구축 각도, 복합 근육 활동 전위, 전경골근의 등척성 수축력, 전경골근의 무게와 말초 신경의 조직학적 평가를 하여 비교 분석하였다.

결과: 동결보관된 동종신경이식은 전처리를 하지 않은 군보다 우수하고 자가신경이식과 비슷한 운동 신경 회복을 보였다.

결론: 동결보관을 이용한 동종신경이식의 전처리는 공여 신경에 대한 면역거부 반응을 줄이고 효율적인 운동 신경의 회복 효과가 있다. 따라서 동결처리된 동종신경은 자가 신경의 효율적인 대체 이식물이 될 수 있다.

색인단어: 신경, 동종이식, 자가이식, 동결처리, 탈세포화

접수일 2019년 7월 25일 수정일 2019년 8월 5일 게재확정일 2019년 8월 14일

교신저자 김종필

31116, 천안시 동남구 망향로 201, 단국대학교 의과대학 정형외과학교실

TEL 041-550-3919 FAX 041-550-3094 E-mail kimjp@dankook.ac.kr