



동물실험계획 승인신청서

접수일자 : 2022 . 07 . 14 .

| | | | | |
|-------------------|--|-------------------|--------------------|------------------|
| 연구 과제명 | (국문) 자성나노입자기반의 농축을 통한 장기이식 거부반응의 바이오마커 조기진단 | | | |
| | (영문) Early diagnosis of transplant rejection using magnetic nanoparticles-based enrichment | | | |
| 연구 책임자 | 성 명 | 주진명 | 직 위 | 조교수 |
| | 소 속 | UNIST / 바이오메디컬공학과 | | |
| | 연락처 | 052-217-3251 | E-mail | jjoo@unist.ac.kr |
| | 동물실험윤리교육 이수번호 | | BIC-Study-2020-102 | |

* 동물실험계획 심의 후 승인 된 건에 한해서만 승인번호를 부여합니다. *

[윤리적 동물실험 방법의 준수]

1. 본인은 UNIST 동물실험윤리위원회(Institutional Animal Care and Use Committee) 규정 및 동물실험 관련 법규를 준수할 것을 약속합니다.
2. 본인은 제출한 계획서의 실험 방법을 준수할 것이며 방법 또는 실험동물 마리 수 등 계획을 변경할 경우 변경신청서를 통해 동물실험윤리위원회에 이를 알리고 동의를 얻을 것입니다.
3. 본인은 동물이 참을 수 없는 고통을 호소하거나 질병에 이환되었을 때 안락사를 포함한 수의사의 응급조치가 이루어지는 것에 동의합니다(응급조치 전에 수의사의 지시가 있을 것입니다).
4. 생체효능검증실 시설을 이용하여 동물실험에 참여하는 경우, 해당 하는 모든 연구자는 생체효능검증실 이용자 교육과 동물실험윤리 교육을 이수하였습니다.
5. 본 계획서와 연관이 있는 논문 발표 후 해당 논문에 대한 정보를 위원회에 제공할 예정입니다.
6. 과제 승인 기간은 최대 1년임을 확인하였으며, 1년이 초과할 경우 기간 만료 전 재승인(연장)신청을 통해 동물실험윤리위원회에 이를 알리고 동의를 얻을 것입니다.

계획서에 기재된 사항들은 정확하며 위 사실의 위반 시 동물실험 및 동물실험시설의 이용 제한을 포함한 불이익을 감수할 것을 아래와 같이 서약합니다.

2022 년 07 월 14 일

연구책임자 _____

주진명

(서명 또는 인)



1. 실험 수행 기본 정보 (Information of Investigators)

1-1. 동물실험 수행자에 대한 정보를 기입하여 주십시오.

| 성명 (Name) | 소속 (Department) | 직급 (Position) | 연락처(Contact) (Cell-phone#) | 동물실험윤리교육 이수번호 | 연구자의 역할 (Role) (담당연구자/참여연구자) |
|--------------|--------------------|------------------|-------------------------------|-----------------------|--------------------------------------|
| 주진명 | 바이오메디컬공학과 | 조교수 | 010-6676-5270 | BIC Study-2020-102 | (연구책임자) |
| 김수현 | 바이오메디컬공학과 | 대학원생 | 010-6425-0054 | BIC Study-2021-008 | 수술, 조직채취, 안락사 (참여연구자) |

* 동물실험을 수행할 모든 연구자를 기입하기 바라며, 각 연구자가 실험 중 어떤 역할을 하는지 기입해주시요.

연구책임자가 직접 동물실험을 수행할 경우 아래와 같이 위 란에 **해당 정보를 기입하여** 주시기 바랍니다.

* **관리담당연구자**는 동물실험윤리위원회(IACUC) 및 생체효능검증실과 연락 및 관련 업무 관리를 담당해야 합니다.
반드시 한 명 이상 지정해야 합니다.

1-2. 실험수행 기간

동물실험윤리위원회 승인일 ~ 2023 년 07 월 05 일 까지 / 총 (1)년 중 (1)년째

* **1회 과제 승인 기간은 최대 1년**이며, 1년을 초과하여 실험이 진행 될 경우, 반드시 **기간 만료 전 재승인(연장)** 신청이 이루어져야 합니다.

* 재승인 신청은 최대 2회(총 연구기간 3년)까지 가능합니다.

2. 동물실험의 범주 및 종류 (Grade and Procedure of Study)

2-1. 동물실험의 범주를 선택하여 주십시오. (Level of Pain)

| | |
|---|---|
| | Grade A: 죽은 생물체를 이용하는 실험 또는 식물, 세균, 원충 또는 무척추동물을 이용한 교육 또는 연구 |
| | Grade B: 척추동물을 사용하지만 거의 스트레스를 주지 않는 교육 또는 연구 |
| | Grade C: 척추동물을 대상으로 단시간의 경미한 통증 또는 스트레스가 가해지는 교육 또는 연구 |
| V | Grade D: 척추동물을 대상으로 중등도 이상의 고통이나 억압을 동반하는 교육 또는 연구 |
| | Grade E: 척추동물을 대상으로 극심한 고통이나 억압 또는 회피할 수 없는 스트레스를 동반하는 교육 또는 연구 |

2-2. 동물실험의 종류를 선택하여 주십시오. (V) (Select Procedure)

| | | | | |
|---|-------------|---|-------------|---------|
| V | 시료의 투여 및 접종 | V | 재료 및 시료의 채취 | 유전 및 육종 |
|---|-------------|---|-------------|---------|



| | | | | | |
|---|--|--|-------------------------|--|------------------------|
| | (Material injection or inoculation) | | (Sampling) | | (Genetics or Breeding) |
| V | 외과적 처치 (Surgical procedure) | | 방사선 조사 (Irradiation) | | 감염 (Infection) |
| | 생리적 상태 및 행동 관찰 (Observation of physical status or behavior) | | 발암 (Carcinogenesis) | | 기타 (Other) |

3. 실험동물 (Laboratory Animals)

- * 생체효능검증실험로 동물을 반입할 경우, 지정된 동물생산회사에서는 신청 후 다음 주에 반입 가능합니다.
(대한바이오파마, 오리엔트바이오, 중앙실험동물)
- * 지정되지 않은 동물생산회사 및 연구협력기관(국내외)으로부터의 동물 반입을 원하실 경우 health report(최근 18개월 분량), SPF certification을 사전에 제출하셔야 합니다.

| 구분 | 1 | | 2 | | 3 | |
|------------------------------------|------------------------------------|--------------|------------------------------------|--------------|-------------|--------------|
| 품종(Species) | Rat | | Rat | | | |
| 계통명(Strain) | Sprague-Dawley (SD) rat | | Wistar rat | | | |
| 유전자형 (Genotype_) | Wild(V) GEM() | | Wild(V) GEM() | | | |
| 성별(Sex) | F | | F | | | |
| 일령, 주령(Age) | 6~8 wks | | 6~8 wks | | | |
| 체중(Weight) | 200-300 g | | ~250 g | | | |
| 수량(Numbers) | 220 | | 112 | | | |
| 미생물 성상 (Microbiological status) | germfree | SPF (V) | germfree | SPF (V) | germfree | SPF |
| | gnotobiotic | conventional | gnotobiotic | conventional | gnotobiotic | conventional |
| 공급처(시설명) Source(vender) | Orient Yeungnam branch (Orient) | | Orient Yeungnam branch (Orient) | | | |

* 필요한 경우 동물정보 입력 칸은 추가하여 입력가능 하며, 추가하실 경우 위 표를 [복사]해서 이 줄에 [붙여넣기]하시면 됩니다.

4. 동물실험 대체법과 불필요한 동물실험의 금지 (Alternatives and Rationale for Animal use)

- * 가능하면 동물실험을 줄이기 위한 노력을 확인하고자 합니다.

4-1. 동물실험의 타당성을 확인하기 위한 것입니다. 다음 사항을 기술하여 주십시오.

(To verify the validity of animal experiments. Please describe the followings.)

정보 확인처 또는 데이터 베이스(Data References):

Mac, Q.D., Mathews, D.V., Kahla, J.A. et al., *Nat Biomed Eng* 3, 281–291 (2019).
 Oellerich, M., Sherwood, K., Keown, P. et al., *Nat Rev Nephrol* 17, 591–603 (2021).
 De Vlaminck, Iwijn, et al., *Science translational medicine* 6.241 (2014).
 Vallabhajosyula, Prashanth, et al., *The Journal of clinical investigation* 127.4 (2017): 1375-1391.

동물 종 선택의 적절성(Appropriateness of the selected species):

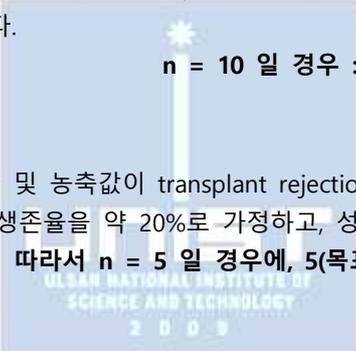
Skin transplantation animal model 혈액에서의 granzyme B 농축 실험을 위해, 1) SD rat, 2) wistar rat을 선정함.
 1) SD rat은 성격이 온순하며, mouse와 비교하였을 때 상대적으로 혈액량이 많아 multiple sampling이 용이하여 실험에 사용하는 개체 수를 줄이기에 적합하여 선정함.
 2) Skin allograft model 형성 시 거부반응 세기를 비교하기 위해 추가적으로 wistar rat를 선정함.

사용동물 수에 대한 적절성(Appropriateness of the number of animals):

*Granzyme B의 농도 측정은 ELISA kit를 이용하여 진행할 예정이며, kit의 operation volume을 고려할 때 최소한 100 ul의 plasma sample 필요(한 마리당 약 200 ul의 혈액 채취를 필요로 함)

Control group

1) Control : Transplantation 없이 아무것도 처리되지 않은 동물
 동물실험에 적합한 건강한 동물을 기준으로 한다. 다만, 10 마리 중 2 마리는 건강하지 않을 수 있으므로(꼬리 휘어짐, 치아손상 등) 12 마리로 한다.



n = 10 일 경우 : 20%는 건강하지 않다 가정하여 12마리

Sham group

2) Sham : Granzyme B 농도의 변화량 및 농축값이 transplant rejection에 의한 것인가를 확인하기 위해 필요
 * 실험에서 사용되는 동물 종에 대해 생존율을 약 20%로 가정하고, 성공률을 약 80%로 본다.

$$\text{따라서 } n = 5 \text{ 일 경우에, } 5(\text{목표수}) / (0.9(\text{생존율}) * 0.8(\text{모델형성율})) = 7\text{마리}$$

$$7(\text{마리}) * 2(\text{군별}) = 14\text{마리}$$

Skin transplantation group (strain 동일×)

Skin allograft model이고, 수술 후 일정기간 동안은 동일하게 immunosuppressive drug, analgesics를 투여

3) Allograft rat model with immunosuppressive drug

$$\text{따라서 } n = 5 \text{ 일 경우에, } 5(\text{목표수}) / (0.9(\text{생존율}) * 0.8(\text{모델형성율})) = 7\text{마리}$$

$$7(\text{마리}) * 4(\text{군별}) = 28\text{마리}$$

4) Allograft rat model without immunosuppressive drug

$$\text{따라서 } n = 5 \text{ 일 경우에, } 5(\text{목표수}) / (0.9(\text{생존율}) * 0.8(\text{모델형성율})) = 7\text{마리}$$

$$7(\text{마리}) * 4(\text{군별}) = 28\text{마리}$$

최종적으로 한 실험 당 82마리씩 필요로 함

단, allograft model 형성 시 control, sham group은 SD rat을 사용할 예정이므로, wistar rat은 56마리만 필요로 함



Skin transplantation group (strain 동일)

Skin allograft model이고, 수술 후 일정기간 동안은 동일하게 analgesics를 투여
 SD rat간의 교차이식을 할 예정임

5) Allograft rat model (SD rat 간의 이식)

두 마리의 skin을 뒤바꾸어 이식하는 방식으로 진행되는 방식으로 사용되는 동물 수를 최소화할 예정

$$\text{따라서 } n = 5 \text{ 일 경우에, } 5(\text{목표수}) / (0.9(\text{생존율}) * 0.8(\text{모델형성율})) = 7\text{마리}$$

$$7(\text{마리}) * 4(\text{군별}) = 28\text{마리}$$

각 실험마다 56마리(Wistar rat), 100마리씩 필요로 하며 (SD rat) , 결과를 검증하기 위해서 1회 반복 예정임

=최종적으로 **Wistar rat**은 112마리, **SD rat** 은 220마리를 필요로 함

5. 실험동물의 사육관리 (Husbandry Management)

- * 생체효능검증실 이용자 교육을 이수하지 않은 연구자는 생체효능검증실에 출입할 수 없습니다.
- * 생체효능검증실에서 사육되는 실험동물은 수의사와 실험동물 기술사에 의해 사육관리가 수행됩니다.
- * 생체효능검증실에서는 정기적으로 미생물 모니터링과 환경모니터링을 실시합니다.

5-1. 실험동물 사육장소 (V) (Housing Zone)

| | | |
|--------------------|---|--------------------|
| Small animals zone | V | Return animal zone |
| BSL-2 zone | | Others (_____) |

* 생체효능검증실 이외 시설에서의 사육 또는 실험 시 해당 건물명, 층호수, 연구실 명 등을 기재하여 주시기 바랍니다.

| 5-2. 실험에 필요한 특수한 반입 물품 (Special Materials) | No search remarks (v) |
|--|-----------------------|
| 생체효능검증센터에 반입이 필요한 장비 및 도구: 수술도구, 일회용 주사기, 마취제, 면역억제제 | |
| 특정사료 공급: | V |
| 그 외 기타: PU film, blood collection위한 EDTA tube, 바세린 거즈 | |

* 생체효능검증실에서 제공하는 물품 이외의 장비 및 도구를 연구자가 실험실 내로 직접 반입하고자 하는 경우, 사전에 담당자와 협의 후 멸균하여 반입

| 5-3. 실험동물 사육구역 이외의 장소로 실험동물 이동(Relocation) | No search remarks (v) |
|--|-----------------------|
| 장소: | |



| | |
|---|--|
| 실습실, 해부실 | |
| 사용장비: | |
| 마취 및 관류 시스템 | |
| 실험내용: | |
| Skin transplantation model 제작 및 채혈, 실험 종료 후 장기 적출 및 조직 확인 | |

- * 생체효능검증실 SPF 구역 내의 mouse, rat은 외부 반출 후 SPF zone으로의 재반입이 불가능합니다.
- * 동물이 반출되는 모든 경우, 반출되기 최소 2일전에 허가를 받아야 합니다. (반출신청서 작성하여 제출)
- * 실험동물 사육구역(4zone) 내에서 해당 구역 이외의 장소로 동물을 이동시켜 실험할 경우 장소, 이용 장비 및 연구 내용을 기재하여 주십시오. (생체효능검증실 지하층 영상분석실은 사육구역에 포함되지 않습니다.)

| 5-4. 사료 및 음수 제한 (실험과정 중 실험동물의 사료 및 음수 섭취를 강제적으로 제한 할 경우) (Restriction of Feed and Water) | | No search remarks (v) |
|--|--|-----------------------|
| 실험기간 | | √ |
| 방 법 | | √ |
| 1회 처치 시간 | | √ |
| 반복 횟수 | | √ |
| 제한 사유 | | √ |

| 5-5. 실험 기간 중 운동제한 (실험과정 중 실험동물의 운동을 강제적으로 제한할 경우) (Require of Mechanical Restraint) | | No search remarks (v) |
|---|--|-----------------------|
| 실험기간 | | √ |
| 방 법 | | √ |
| 1회 처치 시간 | | √ |
| 반복 횟수 | | √ |
| 제한 사유 | | √ |

6. 실험동물의 수의학적 관리 (Veterinary care)

- * 실험과정 중 또는 종료 시에 실험동물의 고통을 줄이기 위해서 적절한 조치를 취해야 합니다.
- * 해당 약제에 표시하여 주십시오. 기타 약제일 경우 기타 난에 기입하여 주십시오.
- * 약품 구입시 처방전이 필요할 경우 생체효능검증실에서 발행해 드립니다.
(문의 : 생체효능검증실 수의사 이윤진, T.5214, leeyj0926@unist.ac.kr)

| 6-1. 실험 중 실험동물의 고통 관리(마취제/ 용량/투여방법/횟수) Pain Control (description of agent name, dose and route) | | 실시자 (Operator) | No search remarks (v) |
|--|--|-------------------|-----------------------|
| 진정/마취제 (Tranquilization/Anesthesia) | Isoflurane / 2% / face mask | 김수현 | |
| 진통(Analgesics) | Ketorolac / 1 mg/kg / IM Buprenorphine / 1 mg/kg / IP | | |
| 기타방법(Others) | | | √ |



| | |
|---|----------|
| 6-2. 안락사 방법 (Method of Euthanasia) | Operator |
| CO ₂ 및 2 % Isoflurane 흡입 마취 이용 | 김수현 |

- * 일반적으로 물리적 방법(경추탈골, 단두)보다 화학적 방법(흡입약제, 주사제, CO₂)을 권장합니다.
- * 안락사에 대한 2007년 미국 수의사회 가이드라인(AVMA Guideline on Euthanasia : Formerly Report of the AVMA Panel on Euthanasia, 2007) : <http://www.avma.org/resources/euthanasia.pdf>참고

| 6-3. 수술 후 관리(*생존성 수술인 경우, 약제종류/용량/투여방법/횟수 등) (Postoperative Care (Describe agent name, dose and route in the survival surgery)) | 실시자 (Operator) | No search remarks (v) |
|--|--|--------------------------|
| 항생제 투여 (Antibiotics Therapy) | | v |
| 진통제 투여 (Analgesics Therapy) | Ketorolac / 1 mg/kg / IM Buprenorphine / 1 mg/kg / IP / 수술 직전 1회 투여 | |
| 기타 (Others) | Tacrolimus / 1.28 mg/kg / IM | |

| | |
|---|--------------------------|
| 6-4. 인도적인 실험 종료의 기준 (*만약 인도적인 안락사 기준이 필요 없을 시라도 그 사유에 대하여 기술해 주십시오.) (Criteria of Endpoint in Animal study (*If don't need criteria, describe what the reason)) | No search remarks (v) |
| 실험 중 이식 부위의 심각한 감염, 괴사나 궤양 혹은 전신적인 염증반응이 일어날 시 (정상동물의 체중과 비교하여 20% 이상의 체중감소가 있을 시)실험을 중단하고 안락사 예정 | |

- * 동물에 극도의 통증 또는 스트레스를 가하는 결과가 예상되는 경우, 적절한 중재, 인도적인 실험종료(humane endpoint) 또는 안락사를 취하기 위한 기준을 제시하여 주십시오. (예: 통증으로 인한 사료섭취량의 감소나 정상 체중의 20% 이상 체중감소 시, 정상 체중의 10%를 초과하는 종양의 형성, 발암 실험의 경우 암 병소의 지름이 20mm이상 발생 시 등)

7. 생물학적 위해 물질 실험 (Animal Study using Biohazards)

- * 안전성 관련 서류를 계획서에 첨부해 주십시오. (예: RI 동위원소의 경우 "방사성동위원소 사용허가증" 첨부, 생물학적 안전도에 대한 근거자료 및 LMO신고서류 등)
- * Infectious agent의 경우 미국 CDC의 Biological level을 참조하시기 바랍니다. 판매처에 근거자료를 요청하시면 편리합니다.
- * 생체효능검증실은 BSL 1~2 등급의 생물학적 위해물질을 이용한 동물실험이 가능한 시설입니다. 그 외 병원균을 이용한 실험은 생체효능검증실로 문의해 주십시오. (이용 가능 물질 : 유전자재조합지침 별표2 참고)

| | |
|--|--------------------------|
| 7-1. 실험과정 중 방사선 핵종, 생물학적 물질, 위험 화학물, 재조합 DNA 등을 투여하는 경우 (Injection of Radionuclides, Biological agents, hazardous chemicals, recombinant DNA and Others) | No search remarks (v) |
|--|--------------------------|



| | | | | | |
|---|--------------------------------------|-----------------------|--------|-------|---|
| 투여 물질(Agent): | | V | | | |
| 용량 및 횟수(Dose): | | | | | |
| 투여 방법(Route): | | | | | |
| 처리 방법(Disposal Method): | | | | | |
| 위해도 유무 및 정도(Infectious potential of Biohazards): | | | | | |
| 동물 → 사람 전염 가능성 (Animal to person) | 동물 → 동물 전염 가능성 (Animal to Animal) | | | | |
| 생물 유해 물질이 동물에서 배출될 가능성 (Excretion) | 배출 경로(Excretion route) : | | | | |
| 7-2. 생물학적 안전도 (생물학적 물질을 투여하는 경우)(v) (Bio-safety Level) | | No search remarks (v) | | | |
| Grade | BS-I | BS-II | BS-III | BS-IV | V |

8. 동물실험의 내용 (Outline of Animal Study)

- * 실험동물에 행해지는 동물실험의 내용에 관하여 상세히 기술해 주십시오.
특히 실험동물을 각 군으로 나눌 경우 이에 관하여 상세히 기술하십시오.
- * **비전문가도 이해할 수 있는 용어**로 써주시고, 인간과 동물복지, 학문 및 사회발전에 미치는 영향에 대해 설명하여 주십시오.
- * 필요한 만큼 칸을 확장하여 기술해 주십시오.
- * 필요한 경우, 관련 서류를 첨부해 주십시오.

8-1. 동물실험의 목적과 예상되는 성과 (Objective and Expected Results of Animal Study)

장기이식의 경우 선천성 심장병 환자 및 말기 장기부전 환자들에게 최후의 수단으로 여겨지고 있다. 장기 이식 후 이식거부반응을 방지하기 위해서 면역억제제를 투여하게 되지만, 그럼에도 수혜자의 면역계에서 거부반응이 일어날 수 있고 그 결과 장기적인 생존율에 영향을 주게 된다. 이식거부반응 중에서도 cytotoxic T cell 활성화 등에 의한 acute cellular rejection (ACR)은 생명과 직결되는 심각한 부작용을 초래할 수 있으므로 조기 진단 및 치료가 필수적이다.

현재 임상에서 장기이식 거부반응은 생검을 통해 진단이 이루어지고 있다. 이 방법의 경우에는 침습적이므로 환자에게 부담이 크고, 이식 받은 장기 중 극히 일부만을 채취하여 조직학적 검사를 통해 진단을 내리게 되어 정확한 진단 및 조기진단에 어려움이 있다는 문제점이 있다. 또한 이러한 방법은 지속적인 면역거부반응의 진단에 적합하지 않다. 문제점을 극복하기 위해 현재 몇몇의 연구그룹에서 보다 덜 침습적이며, real-time monitoring이 가능한 liquid biopsy의 형태로 여러 바이오마커들(exosome, cf-DNA, protein)을 검출하는 시도를 하고 있다. 이러한 바이오마커들은 낮은 농도로 혈액에 존재하게 되고, 대부분 plasma에서 검출하기 때문에 원심분리 등의 시료 전처리 단계를 필요로 한다.

본 연구에서는, 장기이식 거부반응의 바이오마커로 알려진 granzyme B를 직접 합성한 고성능의 자성나노입자 기반의 농축을 통해 혈액에서 효과적으로 검출하고자 한다.

이에 예상되는 결과로, 혈중에 매우 낮은 농도로(~pg/mL) 존재하는 바이오마커를 농축함으로써 조기진단을 가

능하게 할 수 있다. 혈액의 경우 다양한 성분들(protein, blood cells, exosome 등)로 구성되어 있어 별도의 전처리 없이는 선별적으로 분리해 내는 것에 어려움이 있으나, 이를 해결할 수 있을 것으로 예상된다. 또한 효과적으로 농축을 확인했을 시, 다른 미량의 바이오마커들도 농축을 통해 다른 질병의 조기진단도 가능하게 될 것으로 예상된다.

8-2. 동물실험 계획 및 방법 (구체적인 기술)

(Schedule and Methods of Animal Study (Describe detail))

Group

- 1) Control (SD rat) : 12*2=**24** 마리
- 2) Sham : 14*2=**28** 마리
- 3) Skin graft model (SD rat-wistar rat) with immunosuppressive treatment
: 각각 28*2=**56** 마리(SD=**56** 마리, wistar=**56** 마리)
- 4) Skin graft model (SD rat-wistar rat) without immunosuppressive treatment
: 각각 28*2=**56** 마리(SD=**56** 마리, wistar=**56** 마리)
- 5) Skin graft model (SD rat-SD rat) : 28*2=**56** 마리

총 실험기간 : 2022년 7월-2023년 7월

2022년 7-8월 : Skin graft model preparation (SD rat-SD rat)
 Skin transplantation 직전에 마취 후 tacrolimus, 진통제 투여함
 Transplantation 후 바세린 거즈로 덮어준 후에 자가접착식 밴드로 고정함
 매주 몸무게 측정을 진행함



Experimental group

- 1) n = 10 일 경우 20%는 건강하지 않다 가정하여 12마리*2회반복=**24마리**
- 2) n = 5 일 경우에, 5(목표수)/(0.9(생존율)*0.8(모델형성율))=7마리*2(군별)*2회반복=**28마리**
- 3) n = 5 일 경우에, 5(목표수)/(0.9(생존율)*0.8(모델형성율))=7마리*4(군별)*2회반복=각각 **56마리**
- 4) n = 5 일 경우에, 5(목표수)/(0.9(생존율)*0.8(모델형성율))=7마리*4(군별)*2회반복=각각 **56마리**
- 5) n = 5 일 경우에, 5(목표수)/(0.9(생존율)*0.8(모델형성율))=7마리*4(군별)*2회반복=**56마리**

2022년 8-9월 : Skin graft model에서의 혈액 채취 및 자성나노입자 기반의 complex준비
 Granzyme B antibody 붙인 magnetic nanoparticles (Ab-MNP complex) 준비함
 각각의 그룹별로 3일마다 혈액 채취 (꼬리 채혈) 후 Ab-MNP complex 이용하여 농축함
 *채취한 혈액에서 whole blood 상태에서 농축, plasma sample에서 농축의 차이를 비교할 예정
 매주 몸무게 측정을 진행함

2022년 9-11월 : Skin graft model을 포함한 모든 그룹에서의 granzyme B 농도 확인
 모든 그룹에서 지속적으로 채취하여 농축한 혈액을 시중의 ELISA kit를 사용하여 농도값 확인함

농도 변화 값 차이 및 몸무게 변화를 지속적으로 모니터링함으로써 거부반응이 일어난 개체 확인함
매주 몸무게 측정을 진행함

2022년 11-12월 : Rat model sacrifice, 조직 및 장기 채취
Isoflurane으로 마취 후 perfusion, major organ sampling (kidney, heart, liver, lung, spleen)
Skin graft tissue sampling후 H&E staining으로 확인
CO₂를 이용하여 sacrifice

2023년 1-2월 : Skin graft model preparation (SD rat-wistar rat)
Skin transplantation 직전에 마취 후 tacrolimus, 진통제 투여함
Transplantation 후 바세린 거즈로 덮어준 후에 자가접착식 밴드로 고정함
매주 몸무게 측정을 진행함

2023년 2-4월 : Skin graft model에서의 혈액 채취 및 자성나노입자 기반의 complex준비
Granzyme B antibody 붙인 magnetic nanoparticles (Ab-MNP complex) 준비함
각각의 그룹별로 3일마다 혈액 채취 (꼬리 채혈) 후 Ab-MNP complex 이용하여 농축함
*2022년 8-9월에 확인한 granzyme B 농축값이 차이가 위의 graft model (SD rat-wistar rat)에서 동
일하게 나타나는가를 확인함
매주 몸무게 측정을 진행함

2023년 4-6월 : Rat model sacrifice, 조직 및 장기 채취
Isoflurane으로 마취 후 perfusion, major organ sampling (kidney, heart, liver, lung, spleen)
Skin graft tissue sampling후 H&E staining으로 확인
CO₂를 이용하여 sacrifice

2023년 6-7월 : 데이터 분석 및 논문 작업

