

동물실험계획 승인신청서

접수일자 : . . .

연구 과제명	(국문) 다양한 광학 장치를 이용한 소동물 장기 이미징			
	(영문) Small animal imaging by using various optical biomedical imaging modality.			
연구 책임자	성 명	정웅규	직 위	부교수
	소 속	UNIST / 바이오메디컬공학과		
	연락처	C.P)052-217-2542 TEL)010-8464-0110	E-mail	wgjung@unist.ac.kr
	동물실험윤리교육 이수번호		K-2021-46434636	

* 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 제공하겠습니다.
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.

2023 년 3 월 15 일

연구책임자

정웅규



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)
정웅규	바이오메디컬공학과	부교수	010-8464-0110	K-2021-46434636	수술 (연구책임자)
이은지	바이오메디컬공학과	대학원생	010-3958-4420	BIC Study-202112-217 4	수술,조직채취,안락사 (관리담당연구자)
김명주	바이오메디컬공학과	대학원생	010-9380-8427	BIC Study-202303-572	수술,조직채취,안락사 (참여연구자)
백연우	바이오메디컬공학과	연구원	010-5916-1388	BIC Study-202303-524	수술,조직채취,안락 사 (참여연구자)

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

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

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

1-2. 실험수행 기간

동물실험윤리위원회 승인일 ~ 2024 년 5 월 31 일 까지 / 총 (3)년 중 (1)년째

* 1회 과제 승인 기간은 최대 1년이며, 1년을 초과하여 실험이 진행 될 경우, 반드시 기간 만료 전 재승인(연장) 신청이 이루어
져야 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: 작은 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 또

는 연구

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

V	시료의 투여 및 접종 (Material injection or inoculation)	V	재료 및 시료의 채취 (Sampling)	유전 및 육종 (Genetics or Breeding)
V	외과적 처치 (Surgical procedure)		방사선 조사 (Irradiation)	감염 (Infection)
V	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.
(대한바이올링크, 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)	mouse		mouse			
계통명(Strain)	C578L/6		C578L/6			
유전자형 (Genotype_)	Wild(V)	GEM()	Wild(V)	GEM()	Wild()	GEM()
성별(Sex)	M		M			
일령, 주령(Age)	8wks		8wks			
체중(Weight)	18~20g		18~20g			
수량(Numbers)	86		234			
미생물 정상 (Microbiological status)	germfree	SPF	germfree	SPF	germfree	SPF
	gnotobiotic	conventional	gnotobiotic	conventional	gnotobiotic	conventional
공급처(시설명) Source(vender)	Hyochang Science (Daehan Biolink)		Orient Yeungnam branch (Orient)			

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

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):

1. Optimized single-step optical clearing solution for 3D volume imaging of biological structures(2022)
2. Reactive oxygen species/oxidative stress contributes to progression of kidney fibrosis following transient ischemic injury in mice, 2009-mouse
3. Ginaton injection alleviates cisplatin-induced renal interstitial fibrosis in rats via inhibition of apoptosis through regulation of the p38MAPK/TGF β 1 and p38MAPK/HIF1 α pathways, 2021-mouse

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

- C57BL/6은 성격이 온순하며 실험상 비교적 동일한 실험결과를 얻을 수 있음
- 면역연구를 제외한 외과적 처치를 통해 유도된 급성신부전 모델 제작에서 가장 일반적으로 사용하고 있음
- 급성 신장질환은 갑자기 발생하고 이를 방지하였을 때 수개월 또는 수년에 걸쳐 신장기능이 상실되는 만성질환이 되는데 Ischemia/Reperfusion Injury (I/R Injury)모델은 신장 염증화가 유발되어 가장 널리 사용되는 급성신장질환 모델임
- 이 모델은 설치류에서 쉽게 유발되고 재현성이 좋아 세뇨관 간질의 기전 연구에 널리 사용되고 있음
- 급성신부전의 증상경감효능에 대한 다양한 효과를 입증하는 실험에 있어서도 C57BL/6가 사용된 예시가 있고 생물 검정과 약리 연구에 널리 이용되기 때문에 가장 적합하다고 판단됨

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

<실험 1>

* Renal ischemic damage model

: Major renal artery, vein 을 occlusion 할 때 동일한 혈류량을 떨어뜨려 모델을 만드는데, 주변 환경과 온도에 따라, 수술 성공율이 약 70 % 정도 되며, mortality도 약 20% 된다.

따라서 수식은 목표 n수 / 0.8 (생존율) * 0.7 (모델형성율) 이다.

[급성신부전 모델에서 제주자생식물 추출물의 효능 및 기전 규명]

- 정상군 : 외과적 처치를 하지 않은 군(-)
- 대조군 1 : 외과적 처치로 신혈관을 허혈재관류하여 급성신부전을 유도한 군(+)
- 양성대조군 : 대조군 + Enalapril(100mg/L)
- 실험군 1 : 대조군 + Polymethoxyflavones(PMFs) 200mg/kg/day
- 실험군 2 : 대조군 + PMFs 100mg/kg/day
- 실험군 3 : 대조군 + PMFs 50mg/kg/day

>> 각 실험군당 14마리씩 총 6군으로 실험 진행

1) Control : I/R Damage 후 시간별(0, 1, 7일)로 생화학적 실험(5)과 조직염색(5)을 하여 병리학적 변화 및 실험2에서 쓰이는 다양한 광학장비를 이용하여 구조 변화를 알아봄.

각각 n=10 일 경우 : 10 (목표 수) / {0.8 (생존율) * 0.7 (모델형성율)}=17.8마리(약 18마리)

18(마리 수) X 6 (군)=108 약 108마리

N수로 5마리를 잡은 이유는 조직병리, 생화학적 실험 등 에서는 통계치를 추산하기 위해 N수가 5 이상 필요하다. 조직병리 5마리 생화학적 실험 5마리 총 10마리를 N수로 잡게되었다.

실험 2.

* Renal ischemic damage model

: Major renal artery, vein 을 occlusion 할 때 동일한 혈류량을 떨어뜨려 모델을 만드는데, 주변 환경과 온도에 따라, 수술 성공율이 약 70 % 정도 되며, mortality도 약 20% 된다.

따라서 수식은 목표 n수 / 0.8 (생존율) * 0.7 (모델형성율) 이다.

$N=5(\text{목표수}) / \{0.7(\text{생존율}) * 0.8(\text{모델형성율})\} = 8.9\text{마리 (약 9마리)}$

N수로 5마리를 잡은 이유는 1) 광학 장비 촬영 시 5um-200um씩 잘라서 촬영하는데 그 과정에서 샘플의 손실이 크고 이에 한 장의 누락이 있을 때 다시 새로운 샘플로 다시 잘라서 촬영하기 때문, 2) 생존율이 낮은 실험이기 때문에 최소한 5개의 샘플이 필요하다.

그리고 조직병리, 생화학적 실험 등 에서는 통계치를 추산하기 위해 N수가 5이상 필요하다.

또한 clearing 전 후의 이미지가 필요하기 때문에 2배의 마릿수가 필요하다.

1. 1300 SD OCT	9
2. 1300 SS OCT	9
3. Serial OCM	9
4. 800 OCT	9
5. 800 OCM	9
6. Micro-CT	9
7. Portable QPI	9
8. Fluorescence combined QPI	9
9. 3D QPI	9
10. H&E, Luxol fast staining	9
11. Immunohistochemical staining	9
12. Periodic acid-Schiff stain	9
13. Silver staining	9


따라서 13가지 조건 * 9마리 * clearing 전,후 = 234마리가 필요하다.

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	Return animal zone
--------------------	--------------------

	울산과학기술원 동물실험윤리위원회 Ulsan National Institute of Science and Technology Institutional Animal Care and Use Committee	심의서식 1 (version 2.1, 2015.12)	
	BSL-2 zone	V	Others (유니스트 110동 709 의광학 연구실)

* 생체효능검증실 이외 시설에서의 사육 또는 실험 시 해당 건물명, 층·호수, 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:	V
특정사료 공급:	V
그 외 기타:	V

* 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: 110동 709	
사용장비: OCM(optical coherence microscopy), QPI(qantitative phase imaging) OCT(Optical Coherence Tomography), Micro-CT, Confocal microscopy, Fluorescence microscope,. Bright field microscopy	
실험내용: OCM,QPI imaging, Histology slide 제작	

* 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	V
방 법	V
1회 처치 시간	V
반복 횟수	V
제한 사유	V

5-5. 실험 기간 중 운동제한 (실험과정 중 실험동물의 운동을 강제적으로 제한할 경우) (Require of Mechanical Restraint)	No search remarks (v)
실험기간	V
방 법	V



1회 처치 시간		V
반복 횟수		V
제한 사유		V

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/ 1.5%/ 흡입식	이은지 백연우	
진통(Analgesics)			V
기타방법(Others)			V

6-2. 안락사 방법 (Method of Euthanasia)	Operator
CO ₂	이은지

- * 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)	① 항생제 Dexamethasone 0.2mg/kg		V
진통제 투여 (Analgesics Therapy)			V
기타 (Others)	수술 후 Phosphate buffered saline 1ml를 복강 주사하여 빠른 회복을 돕는다. 수술 후 염증반응 억제를 위해 항생제 Dexamethasone을 0.2mg/kg으로 복강 주사한다.	백연우 이은지	V

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 임상증상의 발현 등이 관찰되거나 감염 등으로 인해 비슷한 주령의 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 용어로 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)

Mouse를 이용한 급성신질환 모델은 신장질환 연구에 많은 기여를 하였다. 기존의 방법은 주로 특정 기전을 저해하는 약물을 투여하였지만 다양한 질병기전에는 적합하지 못하였고 질병의 정도에 따라 효과가 미비한 등의 한계를 가졌다. 이러한 점을 극복하기 위해 급성신부전의 경감을 위한 항염 항산화에 특화된 보조소재개발을 목적으로 하여 연구를 진행 할 예정으로 소재의 효능검증을 위해 7일간 실험을 진행하여 신장질환 연구에 이바지하고자 한다. 이는 질환을 유도하여 질병의 메커니즘과 함께 형태학적 분석을 통하여 질환의 증상 개선에 사용 할 수 있을 것이며 제주자생식물소재에 대한 새로운 가능성을 제시할 것이다. 뿐만 아니라 이를 분석하는 기존의 방법인 histopathological 방법은 너무 많은 시간과 노동, 그리고 여러 가지 Staining step 으로 인하여 실험에 있어서 많은 어려움을 초래 해왔다. 이러한 한계를 극복하기 위해 Label free 한 테크닉인 QPI와 OCT 장비 등을 사용하여 다양한 질병을 진단하고 histology를 대체하여 신장질환을 포함한 다양한 장기 질병 연구에 이바지하고자 한다. 다양한 질환을 유도하여 질병의 메커니즘과 형태학적 분석을 통하여 질환진단에 사용 할 수 있을 것이다.

8-2. 동물실험 계획 및 방법 (구체적인 기술)

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

실험1.

실험동물에 테렐액을 이용해 호흡 마취시킨 후 수술한다. 마취 횟수는 수술 시 1회이며 수술이 종료될 때까지이다.

오른쪽 신장을 노출시킨 뒤 30분간 non-traumatic clip을 이용하여 신장 혈관을 막고 허혈을 준다. 이후 일주일동안 재관류하는 급성신부전 모델인 허혈/재관류모델은 정상군 : 외과적 처치를 하지 않은 군(-) 14마리, 대조군 1 : 외과적 처치로 신혈관을 허혈재관류하여 급성신부전을 유도한 군(+) 18마리, 대조군 2 : 대조군 + Cisplatin(15mg/kg) 14마리, 양성대조군 : 대조군 + Enalapril(100mg/L) 18마리, 실험군 1 : 대조군 + Polymethoxyflavones(PMFs) 200mg/kg/day 18마리, 실험군 2 : 대조군 + PMFs 100mg/kg/day 18마리, 실험군 3 : 대조군 + PMFs 50mg/kg/day 18마리의 실험동물 군이 필요하다.

일정 기간 뒤 CO² 주입하여 안락사 시킨 후 Kidney를 dissection한다.

[생화학적 샘플링]

- 심장에서 전혈한 혈액은 4°C, 600 Xg에서 15분간 원심 분리하여 혈청을 분리하여 Creatinine, Glomerular Filtration Rate(GFR) 분석을 위해 사용한다.
- 뇨는 Metabolic cage에서 24시간 동안 배출한 뇨와 먹은 물, 사료의 양을 체크한 후 4°C, 600 Xg에서 15분간 원심 분리하여 상등액 만을 사용하여 Creatinine, Glomerular Filtration Rate(GFR), 단백뇨 분석에 사용한다.
- 양측 신장을 적출하여 구분하고 액체질소에 급속 냉각하여 -70°C에 보관 후 차가운 상태의 Lipa buffer를 넣은 뒤 homogenizer로 마쇄하여 얻은 균질액을 3000 Xg에서 20분간 원심분리 한다. 이를 항산화능, Western blot 분석에 이용한다.

[조직학적 샘플링]

- 좌심실에 PBS로 채운 21Gauge의 Syringe를 넣은 뒤 우심방을 절개하여 30mL 관류한다. 혈액이 충분히 관류되어 PBS만이 누출되기 시작하면 10% Neutral Buffered Formalin(NBF)를 관류하여 고정한다.

- 양측 신장을 적출하여 구분하여 보관하고 탈수 후 파라핀에 포매하여 조직샘플을 만들고 H&E, Tricome, IHC 염색에 이용한다.

-여기서 만들어진 샘플은

7. Portable QPI
8. Fluorescence combined QPI
9. 3D QPI

세가지 장비로 촬영한다.

2024년 02 ~ 2024년 05월: 위 실험샘플로 데이터 분석 및 논문 작성.

실험2.

실험동물에 테렐액을 이용해 호흡 마취시킨 후 수술한다. 마취 횟수는 수술 시 1회이며 수술이 종료될 때까지이다.

좌심실에 PBS로 채운 21Gauge의 Syringe를 넣은 뒤 우심방을 절개하여 30mL 관류한다. 혈액이 충분히 관류되어 PBS만이 누출되기 시작하면 4% PFA(Paraformaldehyde)를 관류하여 고정한다.

Kidney, spinal cord, heart, spleen,intestine, liver,stomach, skin, brain, colon을 dissection한다.

그리고 장기를 PFA에 하루 동안 고정한 후 Agarose에 embedding하여

1. 1300 SD OCT	9
2. 1300 SS OCT	9
3. Serial OCM	9
4. 800 OCT	9
5. 800 OCM	9

6. Micro-CT	9
7. Portable QPI	9
8. Fluorescence combined QPI	9
9. 3D QPI	9

장비로 이미징 한다.

Histology의 경우에는 고정된 장기를 탈수 후 파라핀에 포매하여 조직샘플을 만든다.

10. H&E, Luxol fast staining	9
12. Periodic acid-Schiff stain	9
13. Silver staining	9

10번의 조건에서 Spinal cord, Brain은 Luxol fast staining을 그 외 장기는 H&E 고정 시킨다.

Brian과 Spinal cord를 제외하고는 12,13번의 Stianing을 진행하여 H&E에서 보이지 않았던 구조를 관찰하고자한다.

11. Immunohistochemical staining	9
----------------------------------	---

Kidney, spinal cord, heart, spleen,intestine, liver, stomach, skin, brain, colon을 11번 한 후 형광 이미징을 진행한다.

이후

OptiMuS (Optimized single-step optical clearing Method that preserves fluorescence and Size of the sample for 3D volume imaging)을 이용하여 조직 투명화 과정을 거쳐 동일한 방법으로 실험을 재 진행

각각의 이미징 툴을 이용하여 장기 구조 및 혈관 분포를 분석

다양한 이미징 툴과 staining 기법을 이용하여 인공지능을 학습 시켜 가상 조직 염색을 하고자함.

사용 승인일~2024.2월 위의 실험 진행

2024.2 ~5월: 데이터 분석 및 논문 작성

