



## 동물실험계획 승인신청서

접수일자 : 2024 . 05 . 14 .

연구 과제명	(국문) 생체모사물질을 이용한 조직 재생연구			
	(영문) Development of the biomaterial for tissue regeneration			
연구 책임자	성 명	강주현	직 위	부교수
	소 속	UNIST / 바이오메디컬공학과		
	연락처	3041	E-mail	jookang@unist.ac.kr
	동물실험윤리교육 이수번호		BIC Study-2020-319	

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

### [ 윤리적 동물실험 방법의 준수 ]

- 본인은 UNIST 동물실험윤리위원회(Institutional Animal Care and Use Committee) 규정 및 동물실험 관련 법규를 준수할 것을 약속합니다.
- 본인은 제출한 계획서의 실험 방법을 준수할 것이며 방법 또는 실험동물 마리 수 등 계획을 변경할 경우 변경신청서를 통해 동물실험윤리위원회에 이를 알리고 동의를 얻을 것입니다.
- 본인은 동물이 참을 수 없는 고통을 호소하거나 질병에 이환되었을 때 안락사를 포함한 수의사의 응급조치가 이루어지는 것에 동의합니다(응급조치 전에 수의사의 지시가 있을 것입니다).
- 생체효능검증실 시설을 이용하여 동물실험에 참여하는 경우, 해당 하는 모든 연구자는 생체효능검증실 이용자 교육과 동물실험윤리 교육을 이수하였습니다.
- 본 계획서와 연관이 있는 논문 발표 후 해당 논문에 대한 정보를 위원회에 제공할 것입니다.
- 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 05 월 14 일

연구책임자

강주현

(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)
강주현	바이오메디컬공학 과	부교수	010-9772-7582	BIC Study-2020-319	수술,조직채취,안락사 <b>(연구책임자)</b>
정수현	바이오메디컬공학 과	대학원생	010-8936-3858	BIC Study-2020-1107	수술,조직채취,안락사 (참여연구자)
Brian Choi	바이오메디컬공학 과	대학원생	010-7298-5676	BIC Study-2020-1332	수술,조직채취,안락사 (참여연구자)
최주해	바이오메디컬공학 과	대학원생	010-2732-5012	BIC Study-202211-2617	수술,조직채취,안락사 (참여연구자)
이중현	바이오메디컬공학 과	대학원생	010-2738-3404	BIC Study-202309-2171	수술,조직채취,안락사 (참여연구자)
김소정	바이오메디컬공학 과	대학원생	010-4161-1664	BIC Study-202405-1269	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.

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

1-2. 실험수행 기간

동물실험윤리위원회 승인일 ~ 2026 년 01 월 15 일 / 총 ( 3 )년 중 ( 2 )년째  
울산과학기술원 동물실험윤리위원회 승인일 ~ 2026 년 01 월 15 일 까지

\* 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 또는 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)	V	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.  
(대한바이오링크, 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		4	
품종(Species)	mouse		mouse		mouse		Rat	
계통명(Strain)	BALB/C nude		C57BL/6		BALB/C		SD	
유전자형 (Genotype_)	Wild( V )		Wild( V )		Wild( V )		Wild( V )	
	GEM( )		GEM( )		GEM( )		GEM( )	
성별(Sex)	M or F		M or F		M or F		M or F	
일령, 주령 (Age)	6~8 wks		6~8wks		6~8wks		6~8 wks	
체중(Weight)	22~29 g		18~20g		18~20g		300~400 g	
수량 (Numbers)	480		340		280		420	
미생물 성상 (Microbiological status)	germfree	SPF	germfree	SPF	germfree	SPF	germfree	SPF
	gnotobiotic	conventional	gnotobiotic	conventional	gnotobiotic	conventional	gnotobiotic	conventional
공급처(시설명)	오리엔트바이오, 대한바이오링크(효창)		오리엔트바이오, 대한바이오링크(효창)		오리엔트바이오, 대한바이오링크(효창)		오리엔트바이오, 대한바이오링크(효창)	

 <b>울산과학기술원 동물실험윤리위원회</b> Ulsan National Institute of Science and Technology Institutional Animal Care and Use Committee		심의서식 1 (version 2.1, 2015.12)		
Source(vendor)	사이언스)	사이언스)	사이언스)	사이언스)

\* 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):

- 1) NPG Asia Materials, 2019, 11(1), 1-11  
(BALB/C nude mouse 모델에서 인공물질을 피부 상처에 이식하여 피부 조직 치료 및 재생 확인)
- 2) Advanced functional materials, 2017, 27(33), 1700798  
(BALB/C nude mouse 모델에서 ischemia 상태의 혈관 재생을 위한 인공물질을 이식)
- 3) Small, 2019, 15(25), 1901397  
(BALB/C nude mouse 모델에서 근육 조직 재생을 위한 인공물질을 이식)
- 4) Biomaterials Research. 2010 14(1): 30-36  
(SD rat을 이용하여 감염, 화상을 유발 한 후 인공물질을 이식)
- 5 Science translational medicine, 2019, 11(490), eaat8329  
(C57BL/6 mouse 모델에서, 아토피성 피부 상처에 박테리아 감염 후 퀴럼 센싱 (quorum sensing) 진행)
- 6 Proceedings of the National Academy of Sciences, 2018, 115(3), 477-482  
(Balb/C mouse 모델에서 실크소재의 인공물질을 추간연골에 이식)

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

##### 실험 1. 생체 모사 물질 이식 및 치료 효과 관찰

BALB/C nude mouse를 인공물질, 생체물질 이식 모델로 많이 사용되고 있으므로, 선행 연구들을 토대로 선택하였음. BALB/C nude mouse model은 림프구를 생산하지 않아(Severe Combined Immunodeficiency 모델), 이종세포이식 실험에 이상적인 모델임. 또한 SD rat은 피부 화상 혹은 감염에 따른 손상 후 회복 실험에 주로 사용됨.

##### 실험 2. 나노 물질의 박테리아 감염 피부 재생 효과 관찰

기존 연구들에서 in vivo 피부 감염 모델로써 소형동물 중 C57BL/6 mouse을 주로 사용함.

##### 실험 3. 생체적합물질 이식 및 치료 효과 관찰

기존 연구들에서 in vivo 생체적합물질 이식 동물로써 소형동물 중 mouse 혹은 rat 모델을 주로 사용함. 생체적합물질의 크기에 따라서 mouse 와 rat 모델을 사용할 예정임.

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

- 미국 식품의약국(FDA) 기준에 따르면, 분석결과가 통계학적 의미를 가지려면 적어도 3번 이상의 반복검증이 필요함. (Statistical Reviews, Center for Drug Evaluation and Research, The U.S. FDA)
- 통계적 검증력 분석(statistical power analysis)에 의하면, 두 가지의 실험 조건을 비교분석시 (예: device vs. no device) 최소 각각 3번의 반복검증이 필요하며, Cohen(1988)이 제시한 유의수준(alpha)은 0.05는 통계적 검정력, 60%에 해당함. 이 수치는 60%의 확률로 treatment group에서 제어된 조건이 효과가 있다는 것을 의미.
- 하지만 반복검증에 기초한 통계적 검증력 분석 계산법인 Laubscher's non-central F-distribution equation에 의하면, 검증샘플수(sample replicate)와 검증력(power)은 비선형적 관계(non-linear relationship)를 지니고 있음.

- 상기 가정했던 조건 ( $\alpha=0.05$ , groups=2)에서 보면,  $n=3$  일 경우 검증력은 60%,  $n=4$ ; 70%, 그리고  $n=5$ ; 74%로  $n$  이 늘어남에 따라 선형적으로 증가하지 않음을 알 수 있으며, 따라서 동물의 희생을 최소화하며 의미 있는 데이터의 확보를 위해서는  $n=4$  로 정할 수 있음.
- 하지만 50%의 치사율을 보일 수 있는 실험의 경우, 필요 동물 수를 최소화 하더라도 매우 큰 검증력(stastical power)이 요구될 수 있음.

#### 실험 1-1) 생체 모사 물질 이식 및 치료 효과 관찰

- 생체 모사 물질이식 모델: 시간별 (하루~일주일 주기: 1~28 days) 로 조직 변화를 알아볼 예정임.
- 생체 모사 물질 내 세포 구성에 따라서 총 2가지 type 에 대한 검증이 필요함.
- mouse 에 생체모사 물질 이식 후 시간별로 조직의 변화 및 운동성의 변화를 관찰이 필요함.

각각  $n=5$  일 경우: 5(목표수)/(실험 성공율: 0.5)=10 마리

$$10(\text{마리 수}) \times 14(\text{시간별}) = 140 \text{ 마리}$$

- rat 에 생체모사 물질 이식 후 시간별로 조직의 변화 및 운동성의 변화를 관찰이 필요함.

각각  $n=5$  일 경우: 5(목표수)/(실험 성공율: 0.5)=10 마리

$$10(\text{마리 수}) \times 14(\text{시간별}) = 140 \text{ 마리}$$

#### 실험 1-2) 당뇨 모델에 생체 모사 물질 이식 및 치료 효과 관찰

- Streptozotocin을 투여하여 mouse 에 당뇨 유발 후, 생체모사 물질의 이식을 진행할 예정임.
- 생체 모사 물질이식 모델: 시간별 (하루 주기: 1~14 days) 로 조직 변화를 알아볼 예정임.
- 생체 모사 물질 내 세포 구성에 따라서 총 2가지 type 에 대한 검증이 필요함.
- mouse 에 생체모사 물질 이식, 감염 후 시간별로 조직의 변화를 관찰이 필요함.

각각  $n=5$  일 경우: 5(목표수)/(실험 성공율: 0.5)=10 마리

$$10(\text{마리수}) \times 7(\text{시간별}) \times 2(\text{type별}) = 140 \text{ 마리}$$

#### 실험 1-3) 화상으로 인한 조직 손상 모델 생체 모사 물질 이식 및 치료 효과 관찰

- 고온의 금속막대로 피부에 화상 유발 후, 생체 모사 물질의 이식을 진행할 예정임.
- 생체 모사 물질 내 세포 구성에 따라서 총 2가지 type 에 대한 검증이 필요함.
- mouse 에 생체모사 물질 이식, 감염 후 시간별로 조직의 변화를 관찰이 필요함.

각각  $n=5$  일 경우: 5(목표수)/(실험 성공율: 0.5)=10 마리

$$10(\text{마리수}) \times 7(\text{시간별}) = 70 \text{ 마리}$$

- rat 에 생체모사 물질 이식, 감염 후 시간별로 조직의 변화를 관찰이 필요함.

각각  $n=5$  일 경우: 5(목표수)/(실험 성공율: 0.5)=10 마리

$$10(\text{마리수}) \times 7(\text{시간별}) = 70 \text{ 마리}$$

#### 실험 1-4) 생체 모사 물질 이식 후 박테리아 감염 저항성 효과 관찰

- 생체 모사 물질 이식 후, 박테리아 감염에 대한 저항성 효과를 검증하고자함.
- 생체 모사 물질 내 세포 구성에 따라서 총 2가지 type 에 대한 검증이 필요함.
- mouse 에 생체모사 물질 이식, 감염 후 시간별로 조직의 변화를 관찰이 필요함.

각각  $n=5$  일 경우: 5(목표수)/(실험 성공율: 0.5)=10 마리

$$10(\text{마리수}) \times 7(\text{시간별}) = 70 \text{ 마리}$$

- rat 에 생체모사 물질 이식, 감염 후 시간별로 조직의 변화를 관찰이 필요함.

각각  $n=5$  일 경우: 5(목표수)/(실험 성공율: 0.5)=10 마리

10(마리수)\*7(시간별)=70 마리

**실험 1-5) Femoral artery ligation 모델을 통한 생체 모사 물질 이식 및 치료 효과 관찰**

- Hindlimb ischemia model 모델을 제작한 후, 상기의 제작한 생체 모사물질을 이식하여 혈관 회복 정도 알아볼 예정임
- 최대 4주간 시간별로
- .n=5 를 목표로 함  
5(목표수)/0.5(실험 성공률)=10 마리

10(마리 수)\*3(치료, 미치료, sham operation)\*2(혈류량 관찰, 조직 변화 관찰)=60 마리

**실험 2-1) 나노 물질의 type 별 박테리아 감염 조직 재생 효과 관찰**

- mouse에서 나노물질을 2~14 일 동안 (하루 단위) 감염원에 감염된 조직 부위에 투여하여 회복되는 정도를 확인
- 나노 물질 종류 총 4 가지에 대한 test 가 필요함
- n=5를 목표로 함  
5(목표수)/0.5(실험 성공률)=10 마리

10(마리 수)\*4(나노 물질 종류별)\*2(박테리아 종류)=80 마리

**실험 2-2) 나노물질의 농도별 박테리아 감염 조직 재생 효과 관찰**

- mouse에서 나노물질을 2~14 일 동안 (하루 단위) 감염원에 감염된 조직 부위에 투여하여 회복 되는 정도를 확인
- 나노 물질 농도 총 4 가지에 대한 test 가 필요함
- n=5를 목표로 함  
5(목표수)/0.5(실험 성공률)=10 마리

10(마리 수)\*4(나노 물질 농도별)\*2(박테리아 종류)\*5(나노 물질 투여 횟수)=400 마리

**실험 3. 생체적합물질 이식 및 치료 효과 관찰**

- 생체적합물질 이식 mouse 모델: 시간별 (하루 주기: 1~14 days) 로 세포 및 조직 변화 (H&E stain)을 알아봄.

각각 n=5 일 경우: 5(목표수)/0.5(실험 성공률)=10 마리

10(마리 수)\*14(시간별)=140 마리

- 생체적합물질 이식 rat 모델: 시간별 (하루 주기: 1~14 days) 로 세포 및 조직 변화 (H&E stain)을 알아봄.  
각각 n=5 일 경우: 5(목표수)/0.5(실험 성공률)=10 마리

10(마리 수)\*14(시간별)=140 마리

## 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)

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



- \* 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: 수술도구, 카메라, 붕대, tissue bond, tissue punch, 테가덤 드레싱, temperature sensor, peristaltic pump, warming pad, syringe pump, 금속 막대	V
특정사료 공급:	
그 외 기타: 용액 내 생체 모사 물질, 생체적합물질 (너비 8*8 cm, 높이 2 cm 크기의 플라스크에 밀봉하여 반입)	

- \* 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: 해부실, 영상분석실, 110동 804호 강주현 교수님 실험실	
사용장비: Pharmascan 7T, Xtreme, Skyscan 1176, EG1150H+C, RM2255, STP120, Smart 2.5, Cryostat, H&E, Microtome, Paraffin embedding center, Tissue-processor, microscope, Western blotting, Plate reader	
실험내용: <ul style="list-style-type: none"> <li>이식 조직 추출 후, 혈관 형성과 이식부위 구성 세포의 분포를 확인 필요, 조직의 변화 확인 (Cryostat H&amp;E Microtome Paraffin embedding center Tissue-processor, microscope, microscope, Western blotting, Plate reader)</li> <li>혈관의 형성 위치와, 혈관 내 혈액 순환이 이루어지는지 확인 (Pharmascan 7T, Xtreme, EG1150H+C, Skyscan 1176, RM2255, STP120)</li> </ul>	

- \* 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)	① Isoflurane/0.5-4%/Inhalation	강주현 정수현 Brian Chol 최주해 이중현 김소정	
진통(Analgesics)	① Carprofen: 2~5mg/kg 피하 주사, 경구 투여, 1~2 일에 한 번 (생리식염 주사액에 희석하여 사용) ② Meloxicam: 1-2mg/kg 피하 주사, 경구 투여, 1~2일에 한 번 (생리식염 주사액에 희석하여 사용) ③ Tramadol: 1-50 mg/kg, 피하 주사, 경구 투여, 12시간에 한 번 ④ Nefopam 20-60 mg/kg, 피하 주사, 복강 내 주사	강주현 정수현 Brian Chol 최주해 이중현 김소정	
기타방법(Others)			V

6-2. 안락사 방법 (Method of Euthanasia)	Operator
CO <sub>2</sub> , 경추탈골(실험 수행중 화학적 안락사가 실험결과의 해석에 부정적 영향을 미치는 경우 경추탈골 실시), Cardiac stick (혈액샘플 채취시)	강주현 정수현 Brian Chol 최주해 이중현 김소정

- \* 일반적으로 물리적 방법(경추탈골, 단두)보다 화학적 방법(흡입약제, 주사제, CO<sub>2</sub>)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 Ampicillin, 20 ~ 100 mg/kg, 경구 투여/피하주사/근육내 투여, 8시간~12시간 사이 (Ampicillin 분말형태의 경우, 5% 포도당 주사액 혹은 생리식염 주사액에 희석하여 사용) ② Enrofloxacin, 5 ~10mg/kg, 피하 투여, 복강 투여, 경구 투여, 12시간 마다 1번 투여 (생리식염 주사액에 희석하여 사용)	강주헌 정수현 Brian Chol 최주해 이중현 김소정	
진통제 투여 (Analgesics Therapy)	① Carprofen: 2~5mg/kg 피하 주사, 경구 투여, 1~2 일에 한 번 (생리식염 주사액에 희석하여 사용) ② Meloxicam: 1-2mg/kg 피하 주사, 경구 투여, 1~2일에 한 번 (생리식염 주사액에 희석하여 사용) ③ Tramadol: 1-50 mg/kg, 피하 주사, 경구 투여, 12시간에 한 번 ④ Nefopam 20-60 mg/kg, 피하 주사, 복강 내 주사, 8 - 12시간 마다 최장 7일 동안	강주헌 정수현 Brian Chol 최주해 이중현 김소정	
기타 (Others)			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)
<p>다음과 같은 상태의 동물은 인도적으로 실험을 종료 (안락사).</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. 빈사상태를 보이는 동물 (팽창된 복부, 무기력증의 모습을 보이고, 스스로 일어나지 못함, 물 섭취 못함)</li> <li>2. 마취를 하거나 수술을 한 뒤, 회복하지 못하고 혼수상태를 보이는 동물</li> <li>3. 지속되는 고통에 시달리는 동물 (불안한 행동 및 상태)</li> <li>4. 자해하는 동물</li> </ol> <p>인도적인 실험종료(humane endpoint) 또는 안락사를 취하기 위한 기준 빈사상태의 임상징후에는 저체온증, 호흡곤란, 활동감소, 고통의 흔적(걸음걸이 변화, 신음소리, 경련) 등이 있음. 참여연구자는 2시간의 간격으로 동물들을 관찰하고 임상 통증 점수(clinical and distress score) 평가 실시. 1점을 받은 동물 혹은 8시간동안 진전의 기미가 보이지 않는 2점 동물은 안락사시킴.</p> <p>0=죽음 1=빈사상태 2=탈수, 헝크러진 털, 고통스러운 몸부림, 찌르면 움직이지만 그 외에는 움직임이 없</p>	

는 경우

3=탈수, 헝크러진 털, 움직임 감소

4=거의 정상적인 활동, 윤기 없는 털,

5=정상적인 모습과 활동

- \* 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)
<p>투여 물질(Agent):</p> <p><b>Bacteria:</b></p> <p>Staphylococcus aureus (BSL-2)</p> <p>Staphylococcus lugdunensis (BSL-2)</p> <p>Staphylococcus epidermidis (BSL-1)</p> <p>Streptococcus pyogenes (BSL-2)</p> <p>Streptococcus agalactiae (BSL-2)</p> <p>Enterococcus faecalis (BSL-1)</p> <p>Enterococcus faecium (BSL-2)</p> <p>Escherichia coli (BSL-1)</p> <p>Klebsiella pneumoniae (BSL-2)</p> <p>Klebsiella oxytoca (BSL-2)</p> <p>Enterobacter cloacae (BSL-2)</p> <p>Enterobacter aerogenes (BSL-1)</p> <p>Pseudomonas aeruginosa (BSL-2)</p> <p>Stenotrophomonas maltophilia (BSL-1)</p> <p>Acinetobacter baumannii (BSL-2)</p> <p>Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae (BSL-2)</p> <p>Methicillin-resistant Staphylococcus aureus (BSL-2)</p> <p>Mycobacterium (BSL-2)</p>	



Cutibacterium acnes (BSL-2) Staphylococcus cohnii (BSL-1) Bacillus oleronius (BSL-1) candida albicans (BSL-1)	
<b>Endotoxin:</b> staphylococcal enterotoxin syndrome toxin-1	
용량 및 횟수(Dose): $10^1 \sim 10^9$ CFU/mL, 1회~14회	
투여 방법(Route): 피부에 바름, 피하주사, 정맥주사, 복강주사	
처리 방법(Disposal Method): 10% bleach for 20 min. Biosafety level 2 해당되는 화학적 소독 방법	
위해도 유무 및 정도(Infectious potential of Biohazards): 사용 박테리아의 BSL로는 전염 가능성 없음.	
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) : urine

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	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)

#### • 실험 1. 생체 모사 물질 이식 및 치료 효과 관찰

인체 내에서 기능을 상실한 조직 및 기관을 일시적 또는 지속적으로 대체할 수 있는 인공생체재료의 개발이 지속적으로 이루어지고 있음. 그러나 현재 개발되고 있는 인공생체재료는 그 적용에서 한계가 존재하여, 다양한 조직 및 장기에서의 생체적합성이 뛰어난 인공생체재료의 개발이 필요함. 본 연구에서는 세포외기질 물질을 사용하여 여러 조직에 적용될 수 있는 인공생체모사 조직공학용 지지체 (scaffold)를 개발하고자 함. 동물실험을 통해 개발된 생체 모사 scaffold 가 거부감 없이, 주변 조직과의 결합 혹은 손실된 조직을 대체 및 재생할 수 있음을 검증하려고 함. 본 연구를 통해 개발된 생체모사 물질이 환자에 높은 생체적합성으로 적용될 수 있음을 증명한다

면, 인공생체재료 분야에서 높은 국가경쟁력을 확보할 수 있음.

• **실험 2. 나노 물질의 박테리아 감염 조직 재생 효과 관찰**

피부 박테리아 감염은 지속적인 염증 발생과 다양한 급성, 만성질환을 발생시키게 됨. 또한 감염에 의한 피부 내 박테리아들의 개체 수 변화와 질환 발생의 상관관계에 대한 연구가 활발히 진행되고 있음. 본 연구에서는 피부 박테리아 감염 동물 모델을 만들고, 개발한 나노물질을 이용하여 효과적인 피부 내 박테리아 치료 효과를 검증하고자 함. 실험을 통해, 나노물질 투여 후 피부의 박테리아 개체 수 변화와 피부의 분자적 특성변화에 대한 분석을 진행하여 박테리아 감염 질환에 대한 치료효과를 확인할 예정임. 본 연구의 효과가 검증될 시, 박테리아 감염에 의한 다양한 피부질환 환자 치료를 위한 기술 확보가 가능함.

• **실험 3. 치료용 생체적합물질 이식 효과 관찰**

인체 내 손상되거나 감염된 조직 및 기관의 치료를 위해 다양한 생체적합물질을 동물모델에 이식하여 혈관 재생, 염증 완화, 조직 재생 등을 확인할 예정임. 본 실험을 통해서, 환자에게 이식하기에 적합한 생체적합물질을 동물 모델실험을 통해 탐색하여, 실제 환자에게 필요한 치료용 생체적합물질을 개발하고자 함.

**8-2. 동물실험 계획 및 방법 (구체적인 기술)**

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

**실험 1-1. 생체 모사 물질 이식 및 치료 효과 관찰**

본 실험에서 개발하고자 하는 생체 모사 물질을 mouse, rat에 이식함으로써 생체 적합성 여부 확인과 이식 후의 치료 효과를 검증하고자 함.

- 손상된 조직 (mouse, rat 등(back)의 피부, 지방층, 근육층) 에 개발된 생체 모사 물질 이식
- 생체 모사 물질의 이식 후 mouse, rat의 조직의 회복 정도 확인이 필요:
- 생체 모사 물질의 제원
  - 개발된 생체 모사 물질은 콜라겐 (Collagen)과 같은 세포외 기질을 구성하는 물질로 이루어진 gel 형태로 제작되며, 조직재생에 관여하는 다양한 세포가 추가적으로 배양되어 있음.
  - 생체 모사 물질 내의 세포들의 구성에 따라서 총 2가지 type의 생체 모사 물질 이식 test가 진행될 예정
  - 평판형 형태로, 면적은 0.3×0.3 cm ~ 2×2 cm 에 해당함.
- 생체 모사 물질 이식 모델:
  - 시간별 (하루~일주일 주기: 1~28days) 로 조직 변화 (H&E stain, Immunohistochemistry, 등)를 알아봄.
  - 시간별 (하루~일주일 주기: 1~28days) 로 수술한 근육층에 대한 운동성 회복 정도 검사 (로타로드 검사 (rotarod test), 와이어행 검사(Wire hang test), 발자국 분석 테스트 등)
- 재생된 혈관의 위치, 혈관 내 혈류 발생 여부를 영상장비를 통해 촬영할 예정임.
  - mouse: 각각 n=5 일 경우, 5(목표수)/0.5(실험 성공률)=10 마리  
**10(마리 수)\*14(시간별)=140 마리**
  - rat: 각각 n=5 일 경우, 5(목표수)/0.5(실험 성공률)=10 마리  
**10(마리 수)\*14(시간별)=140 마리**

● **실험계획**

- ① 마취 (isofluorane 0.5-4%, inhalation)
- ② mouse, rat 의 조직 (mouse, rat 등(back)의 피부, 지방, 근육 조직: 0.3×0.3 cm ~ 2×2 cm)을 tissue punch, 수술용 가위, 메스 등을 사용하여 잘라냄.
- ③ 제작된 생체 모사 물질을 잘라낸 조직 (mouse 등(back)의 피부, 지방, 근육 조직: 0.3×0.3 cm ~ 2×2 cm) 부분 위에 고정시킴.

- ④ 테가덤 드레싱과, 봉대를 통해서 수술 부위를 보호한 후 케이지 내에서 회복을 시작함.
- ⑤ Day 0 ~ 최대 Day 14 까지 하루 단위로 생체 모사 물질이 부착한 조직의 회복되는 과정을 관찰.
- ⑥ 회복기간 동안 항생제, 진통제 적정농도를 마시는 물에 섞어서 주입하거나, 12~24시간에 한 번씩 피하 주사를 통해 주입할 예정임 (진통제: Carprofen: 2~5mg/kg 혹은 Meloxicam: 1-2mg/kg 혹은 Tramadol: 1-50 mg/kg 혹은 Nefopam 20-60 mg/kg) (항생제: Ampicillin, 20 ~ 100 mg/kg 혹은 Enrofloxacin, 5 ~10mg/kg)
- ⑦ 회복 기간동안 동물 상태 모니터링 (운동성 테스트)
- 로타로드 검사 (rotarod test): 로타로드 검사는 rotarod 장비에 실험쥐를 올려놓고 속도 4rpm으로 시작하여 점차적으로 속도를 증가시켜 300초 후에 40 rpm으로 증가되어 작동하게 한 후, 트레드밀이 돌아가도록 하였을 때, 실험쥐가 균형을 잃고 바닥에 떨어질 때까지의 시간 (sec), 평균속도를 측정할 예정임.
  - 와이어행 검사 (Wire hang test): 시험은 높이 25 cm에 설치된 직경 2mm의 wire를 사용하여 시험함. 각각의 마우스를 와이어에 뒷다리 만을 사용하여 위치시키고 떨어지지 않고 매달려 있는 시간을 측정함. 마우스가 맨달려 있다가 떨어지는 시간을 측정하여 시험은 최대 120초 동안 실험함. 이와 같은 방법으로 각각의 마우스를 약 20 분 간격으로 3 회 반복함. 3 회의 시험 중 첫번째와 제일 오래 매달린 시간의 평균 값을 각 마우스의 성적으로 결과를 분석할 예정임.
  - 발자국 분석 테스트: 발자국 분석 테스트는 동물의 뒷다리 근육 운동 길이 회복 정도를 평가하는 시험임. 마우스 뒷발 바닥에 잉크를 문힌 후, 하얀 종이가 바닥에 깔린 내부가 어두운 좁은 통로(길이 60 cm, 너비 3 cm)로 지나가게 하면서 발자국을 내게 하였다. 뒷발의 양쪽 각각 3번의 보폭을 평균내어 뒷다리의 기능을 측정할 예정임.
- ⑧ 회복기간 동안 동물 상태 모니터링 (혈류량 촬영)
- ⑨ 회복기간 동안 혹은 치료가 끝난 후, 혈액에서의 특성 변화를 측정하기 위해서 혈액 채취
- ⑩ 치료가 끝난 모델은 CO<sub>2</sub> 주입하여 안락사 예정임.
- ⑪ 치료된 상처 부위를 채취하여, formalin, 파라핀 처리 등을 통해 section slide로 만들어 H&E stain, Immunohistochemistry 등을 수행하여 실험결과 (혈관 형성 정도, 조직세포의 분포)를 분석할 예정임.

#### 실험 1-2. 당뇨 모델에 생체 모사 물질 이식 및 치료 효과 관찰

본 실험에서는 개발하고자 하는 생체 모사 물질의 당뇨 mouse 에 이식한 후, 치료 효과를 검증하고자 함.

- Streptozotocin을 투여하여 mouse에 당뇨 유발
- 손상된 조직 (mouse 등(back)의 피부, 지방층, 근육층) 에 개발된 생체 모사 물질 이식
- 생체 모사 물질 내의 세포들의 구성에 따라서 총 2가지 type의 생체 모사 물질 이식 test가 진행될 예정
- 시간별 (이틀 주기: 1~14 days) 로 조직 변화 (H&E stain, Immunohistochemistry, 등)를 알아봄.
- 재생된 혈관의 위치, 혈관 내 혈류 발생 여부를 영상장비를 통해 촬영할 예정임.

각각 n=5 일 경우: 5(목표수)/0.5(실험 성공률)=10 마리

10(마리 수)\*7(시간별)\*2(type별)=140 마리

#### ● 실험계획

- ① 0.1~0.4 M citrate buffer 에 녹인 streptozotocin을 70~150 mg/kg을 복강 내에 주사
- ② 당뇨 유발 확인 은 streptozotocin 주사 72시간 후에 꼬리 정맥에서 채혈하여 혈당 검사 메스 등을 사용하여 잘라냄.
- ③ 제작된 생체 모사 물질을 잘라낸 조직 (mouse, rat 등(back)의 피부, 지방, 근육 조직: 0.3×0.3 cm ~ 2×2 cm) 부분 위에 고정시킴.
- ④ 테가덤 드레싱과, 봉대를 통해서 수술 부위를 보호한 후 케이지 내에서 회복을 시작함.
- ⑤ Day 0 ~ 최대 Day 14 까지 하루 단위로 생체 모사 물질이 부착한 조직의 회복되는 과정을 관찰.
- ⑥ 회복기간 동안 항생제, 진통제 적정농도를 마시는 물에 섞어서 주입하거나, 12~24시간에 한 번씩 피하 주사를 통해 주입할 예정임 (진통제: Carprofen: 2~5mg/kg 혹은 Meloxicam: 1-2mg/kg 혹은 Tramadol: 1-50 mg/kg 혹은 Nefopam 20-60 mg/kg) (항생제: Ampicillin, 20 ~ 100 mg/kg 혹은 Enrofloxacin, 5 ~10mg/kg)
- ⑦ 회복기간 동안 동물 상태 모니터링 (혈류량 촬영)
- ⑧ 회복기간 동안 혹은 치료가 끝난 후, 혈액에서의 특성 변화를 측정하기 위해서 혈액 채취.

- ⑨ 치료가 끝난 모델은 CO<sub>2</sub> 주입하여 안락사 예정임.  
⑩ 치료된 상처 부위를 채취하여, formalin, 파라핀 처리 등을 통해 section slide로 만들어 H&E stain, Immunohistochemistry 등을 수행하여 실험결과 (혈관 형성 정도, 조직세포의 분포)를 분석할 예정임.

### 실험 1-3 화상으로 인한 조직 손상 모델 생체 모사 물질 이식 및 치료 효과 관찰

본 실험에서는 개발하고자 하는 생체 모사 물질을 화상으로 인해 손상된 mouse의 조직에 이식한 후, 치료 효과를 검증하고자 함.

- 가열한 금속 막대를 통해서 피부조직에 화상 모델을 만들.
- 손상된 조직 (mouse, rat 등(back)의 피부, 지방층, 근육층) 에 개발된 생체 모사 물질 이식
- 생체 모사 물질 내의 세포들의 구성에 따라서 총 2가지 type의 생체 모사 물질 이식 test가 진행될 예정
- 시간별 (이틀 주기: 1~28 days) 로 조직 변화 (H&E stain, Immunohistochemistry, 등)를 알아봄.
- 재생된 혈관의 위치, 혈관 내 혈류 발생 여부를 영상장비를 통해 촬영할 예정임.

mouse: 각각 n=5 일 경우, 5(목표수)/0.5(실험 성공률)=10 마리

**10(마리 수)\*7(시간별)=70 마리**

rat: 각각 n=5 일 경우, 5(목표수)/0.5(실험 성공률)=10 마리

**10(마리 수)\*7(시간별)=70 마리**

#### ● 실험계획

- 마취 (isoflurane 0.5-4%, inhalation)
- 95~150 도로 가열된 금속 막대 (0.3×0.3 cm ~ 2×2 cm)를 털을 제거한 mouse, rat의 피부 조직에 20초~1분 간 올려두어 됨.
- 제작된 생체 모사 물질을 손상된 조직 (mouse, rat 등(back)의 피부, 지방, 근육 조직: 0.3×0.3 cm ~ 2×2 cm) 부분 위에 고정시킴.
- 테가덤 드레싱과, 붕대를 통해서 수술 부분을 보호한 후 케이지 내에서 회복을 시작함.
- Day 0 ~ 최대 Day 28 까지 하루 단위로 생체 모사 물질이 부착한 조직의 회복되는 과정을 관찰.
- 회복기간 동안 항생제, 진통제 적정농도를 마시는 물에 섞어서 주입하거나, 12~24시간에 한 번씩 피하 주사를 통해 주입할 예정임 (진통제: Carprofen: 2~5mg/kg 혹은 Meloxicam: 1-2mg/kg 혹은 Tramadol: 1-50 mg/kg 혹은 Nefopam 20-60 mg/kg) (항생제: Ampicillin, 20 ~ 100 mg/kg 혹은 Enrofloxacin, 5 ~10mg/kg)
- 회복기간 동안 동물 상태 모니터링 (혈류량 촬영)
- 회복기간 동안 혹은 치료가 끝난 후, 혈액에서의 특성 변화를 측정하기 위해서 혈액 채취
- 치료가 끝난 모델은 CO<sub>2</sub> 주입하여 안락사 예정임.
- 치료된 상처 부위를 채취하여, formalin, 파라핀 처리 등을 통해 section slide로 만들어 H&E stain, Immunohistochemistry 등을 수행하여 실험결과 (혈관 형성 정도, 조직세포의 분포)를 분석할 예정임.

### 실험 1-4 생체 모사 물질 이식 후 박테리아 감염 저항성 효과 관찰

본 실험에서는 개발하고자 하는 생체 모사 물질을 mouse, rat 에 이식한 후, 박테리아 감염에 대한 저항성 효과를 검증하고자함.

- 손상된 조직 (mouse, rat 등(back)의 피부, 지방층, 근육층) 에 개발된 생체 모사 물질 이식
- 생체 모사 물질 내의 세포들의 구성에 따라서 총 2가지 type의 생체 모사 물질 이식 test가 진행될 예정
- 생체 모사 물질의 이식 후 10<sup>1</sup>~10<sup>9</sup> CFU/mL 박테리아를 투여함.
- 시간별 (이틀 주기: 1~28 days) 로 조직 변화 (H&E stain, Immunohistochemistry, 등)를 알아봄.
- 재생된 혈관의 위치, 혈관 내 혈류 발생 여부를 영상장비를 통해 촬영할 예정임.

mouse: 각각 n=5 일 경우, 5(목표수)/0.5(실험 성공률)=10 마리

**10(마리 수)\*7(시간별)=70 마리**

rat: 각각 n=5 일 경우, 5(목표수)/0.5(실험 성공률)=10 마리

**10(마리 수)\*7(시간별)=70 마리**



● 실험계획

- ① 마취 (isoflurane 0.5-4%, inhalation)
- ② mouse, rat 의 조직 (mouse, rat 등(back)의 피부, 지방, 근육 조직: 0.3×0.3 cm ~ 2×2 cm)을 tissue punch, 수술용 가위, 메스 등을 사용하여 잘라냄.
- ③ 제작된 생체 모사 물질을 잘라낸 조직 (피부, 지방, 근육 조직: 0.3×0.3 cm ~ 2×2 cm) 부분 위에 고정시킴.
- ③ 생체 모사 물질을 이식한 부위에  $10^1 \sim 10^9$  CFU/mL 농도의 박테리아를 바르거나, 피하주사를 통해 주입함.
- ④ 테가덤 드레싱과, 봉대를 통해서 수술 부분을 보호한 후 케이지 내에서 회복을 시작함.
- ⑤ Day 0 ~ 최대 Day 28 까지 하루 단위로 생체 모사 물질이 부착한 조직의 회복되는 과정을 관찰.
- ⑥ 회복기간 동안 진통제 적정농도를 마시는 물에 섞어서 주입하거나, 12~24시간에 한 번씩 피하 주사를 통해 주입할 예정임 (진통제: Carprofen: 2~5mg/kg 혹은 Meloxicam: 1-2mg/kg 혹은 Tramadol: 1-50 mg/kg 혹은 Nefopam 20-60 mg/kg)
- ⑦ 회복기간 동안 동물 상태 모니터링 (혈류량 촬영)
- ⑧ 회복기간 동안 혹은 치료가 끝난 후, 혈액에서의 특성 변화를 측정하기 위해서 혈액 채취.
- ⑨ 치료가 끝난 모델은 CO<sub>2</sub> 주입하여 안락사 예정임.
- ⑩ 치료된 상처 부위를 채취하여, formalin, 파라핀 처리 등을 통해 section slide로 만들어 H&E stain, Immunohistochemistry 등을 수행하여 실험결과 (혈관 형성 정도, 조직세포의 분포)를 분석할 예정임.

**실험 1-5 Femoral artery ligation 모델을 통한 생체 모사 물질 이식 및 치료 효과 관찰**

- 본 실험에서는 개발하고자 하는 생체 모사물질을 femoral artery ligation 부분에 이식함으로써 혈관 형성, 치료 효과를 검증하고자 함.
- Hindlimb ischemia model 모델을 제작한 후, 상기의 제작한 생체 모사물질을 이식하여 혈관 회복정도 확인이 필요.
- 3일 간격으로 최대 4주간 혈류량, 조직 변화 (H&E stain, Immunohistochemistry 등)을 알아봄.
- 재생된 혈관의 위치 혈관 내 혈류 발생 여부를 영상장비를 통해 촬영할 예정임
- n=5 를 목표로 함

5(목표수)/0.5(실험 성공률)=10 마리

10(마리 수)\*3(치료, 미치료, sham operation)\*2(혈류량 관찰, 조직 변화 관찰)=60 마리

● 실험계획

- ① 마취 (isoflurane 0.5-4%, inhalation)
- ② 무릎에서 넓적다리 방향으로 hindlimb의 피부 및 피하지방을 절개, femoral artery 부분 확보
- ③ 몸 중심 쪽의 femoral artery를 수술용 실로 묶고, 몸 중심에서 먼 쪽 femoral artery를 수술용 실로 묶음
- ④ 수술용 실로 묶인 femoral artery segment를 스프링 가위 등으로 transect 후 절개한 부분을 vicryl suture 혹은 surgical stapler 등으로 봉합함.
- ⑤ 상기 개발된 생체 모사 물질을 transect 한 부분에 이식함.
- ⑥ 봉합 수술 후 4주에 걸쳐 최소 3일 간격으로 동물 상태 모니터링 (혈류량 측정).
- ⑦ 회복기간 동안 항생제, 진통제 적정농도를 마시는 물에 섞어서 주입하거나, 12~24시간에 한 번씩 피하 주사를 통해 주입할 예정임 (진통제: Carprofen: 2~5mg/kg 혹은 Meloxicam: 1-2mg/kg 혹은 Tramadol: 1-50 mg/kg 혹은 Nefopam 20-60 mg/kg) (항생제: Ampicillin, 20 ~ 100 mg/kg 혹은 Enrofloxacin, 5 ~10mg/kg).
- ⑧ 회복기간 동안 혹은 치료가 끝난 후, 혈액에서의 특성 변화를 측정하기 위해서 혈액 채취.
- ⑨ 치료가 끝난 모델은 CO<sub>2</sub> 주입하여 안락사 예정임.
- ⑩ 치료된 상처 부위를 채취하여, formalin, 파라핀 처리 등을 통해 section slide로 만들어 H&E stain, Immunohistochemistry 등을 수행하여 실험결과 (혈관 형성 정도, 조직세포의 분포)를 분석할 예정임.

**실험 2-1. 나노 물질의 type 별 박테리아 감염 조직 재생 효과 관찰**

본 실험에서는 피부조직에 박테리아를 감염시킨 후 나노 물질을 처리하여 치료 효과를 관찰하고자 함.

- 피부 조직에  $10^1 \sim 10^9$  CFU/mL 박테리아를 투여함.



- 총 4 가지 유형의 나노물질을 2~14 일 동안 (하루 단위) 박테리아가 감염된 조직 부위에 바르거나, 피하주사, IV injection 를 통해 주입하여 회복 되는 정도를 확인
- 나노 물질 종류: 4 가지
- 박테리아 종류: 2 종
- n=5를 목표로 함

$$5(\text{목표수})/0.5(\text{실험 성공률})=10 \text{ 마리}$$

$$10(\text{마리 수}) \times 4(\text{나노 물질 종류별}) \times 2(\text{박테리아 종류})=80 \text{ 마리}$$

#### ● 실험계획

- ① 마취 (isoflurane 0.5-4%, inhalation)
- ② mouse의 상피에 바르거나, 피하주사를 통해  $10^1 \sim 10^9$  CFU/mL 농도의 박테리아를 투여함.
- ④ 2~14일 동안 나노물질을 투여하며 박테리아가 감염된 조직의 회복되는 과정을 관찰함.
- ⑤ 회복기간 동안 진통제를 적정농도를 마시는 물에 섞어서 주입하거나, 12~24시간에 한 번씩 피하 주사를 통해 주입할 예정임 (진통제: Carprofen: 2~5mg/kg 혹은 Meloxicam: 1-2mg/kg 혹은 Tramadol: 1-50 mg/kg 혹은 Nefopam 20-60 mg/kg)
- ⑥ 회복기간 동안 혹은 치료가 끝난 후, 혈액에서의 특성 변화를 측정하기 위해서 혈액 채취.
- ⑦ 치료가 끝난 모델은 CO<sub>2</sub> 주입하여 안락사 예정임.
- ⑧ 치료된 상처 부위를 채취하여, formalin, 파라핀 처리 등을 통해 section slide로 만들어 H&E stain, Immunohistochemistry 등을 수행하여 실험결과 (혈관 형성 정도, 조직세포의 분포)를 분석할 예정임.

#### 실험 2-2 나노물질의 농도별 박테리아 감염 조직 재생 효과 관찰

본 실험에서는 피부조직에 박테리아를 감염시킨 후 여러 농도로 나노 물질을 처리하여 치료 효과를 관찰하고자 함.

- 피부 조직에  $10^1 \sim 10^9$  CFU/mL 박테리아를 투여함.
- 총 4 가지 농도의 나노물질을 2~14 일 동안 (하루 단위) 박테리아가 감염된 조직 부위에 바르거나, 피하주사, IV injection 를 통해 주입하여 회복 되는 정도를 확인
- 나노 물질의 투여 횟수: 24시간 단위로 1~5회
- 나노 물질 농도: 4 가지
- 박테리아 종류: 2 종
- n=5를 목표로 함

$$5(\text{목표수})/0.5(\text{실험 성공률})=10 \text{ 마리}$$

$$10(\text{마리 수}) \times 4(\text{나노 물질 농도별}) \times 2(\text{박테리아 종류}) \times 5(\text{나노 물질 투여 횟수})=400 \text{ 마리}$$

#### ● 실험계획

상기 “나노 물질의 type 별 박테리아 감염 조직 재생 효과 관찰”과 동일

#### 실험 3. 생체적합물질 이식 및 치료 효과 관찰

본 실험에서는 생체적합물질을 mouse 에 이식한 후 치료 효과를 검증하고자 함.

- 손상된 피부조직에 개발된 생체적합물질을 이식
- 생체적합물질 이식 후 조직의 회복 정도 확인이 필요
- 생체적합물질 이식 모델: 시간별 (하루 주기: 1~14 days) 로 조직 변화 (H&E stain, Immunohistochemistry, 등)를 알아봄.

$$\text{각각 } n=5 \text{ 일 경우: } 5(\text{목표수})/0.5(\text{실험 성공률})=10 \text{ 마리}$$

$$10(\text{마리 수}) \times 14(\text{시간별})=140 \text{ 마리}$$

본 실험에서는 생체적합물질을 rat 에 이식한 후 치료 효과를 검증하고자 함.

- 손상된 피부조직에 개발된 생체적합물질을 이식
- 생체적합물질 이식 후 조직의 회복 정도 확인이 필요
- 생체적합물질 이식 모델: 시간별 (하루 주기: 1~14 days) 로 조직 변화 (H&E stain, Immunohistochemistry, 등)를 알아봄.

각각 n=5 일 경우: 5(목표수)/0.5(실험 성공률)=10 마리

**10(마리 수)\*14(시간별)=140 마리**

#### ● 실험계획

- ① 마취 (isoflurane 0.5-4%, inhalation)
- ② mouse 혹은 rat의 피부: 0.3×0.3 cm ~ 5×5 cm)를 잘라냄.
- ③ 제작된 생체적합물질을 잘라낸 피부 부분 위에 고정시킴.
- ④ Day 0 ~ 최대 Day 14 까지 하루 단위로 생체적합물질이 이식된 조직의 회복되는 과정을 관찰.
- ⑤ 회복기간 동안 항생제, 진통제 적정농도를 마시는 물에 섞어서 주입하거나, 12~24시간에 한 번씩 피하 주사를 통해 주입할 예정임 (진통제: Carprofen: 2~5mg/kg 혹은 Meloxicam: 1-2mg/kg 혹은 Tramadol: 1-50 mg/kg 혹은 Nefopam 20-60 mg/kg) (항생제: Ampicillin, 20 ~ 100 mg/kg 혹은 Enrofloxacin, 5~10mg/kg).
- ⑥ 회복기간 동안 혹은 치료가 끝난 후, 혈액에서의 특성 변화를 측정하기 위해서 혈액 채취.
- ⑦ 치료가 끝난 모델은 CO<sub>2</sub> 주입하여 안락사 예정임.
- ⑧ 치료된 상처 부위를 채취하여, formalin, 파라핀 처리 등을 통해 section slide로 만들어 H&E stain, Immunohistochemistry 등을 수행하여 실험결과 (혈관 형성 정도, 조직세포의 분포)를 분석할 예정임.

#### 혈액채취

- 혈액채취는 venous catheter, 혹은 lateral tail vein 혹은 cardiac puncture를 통해서 혈액 채취함.
- 단기간 연구 (5 h 이하)의 경우 적어도 30분 단위로 채취될 예정임.
- 단기간 연구 (24 h 이하)의 경우 적어도 0.5~8시간 단위로 채취될 예정임.
- 장기간 연구 (5일 이상)의 경우 적어도 하루 2번 이상 채취될 예정이며, 마취가 필요할 경우 하루 1번 채취될 예정임.
- 혈액의 채취량은 어떤 종이든 동물 총 혈액량의 25%를 넘지 않을 것 (2주 동안) 이며, 한번에 체중의 1% 이상 채취하지 않을 것임. 만약 1% 이상의 혈액을 한번에 채취한다면, fluid (saline) replacement가 이루어질 예정임.
- Venous catheter 혈액 채취: 마취 (isoflurane 2-4%, inhalation). eye lubricant 처리, 필요시 physiologic stress 경감위한 heparin (5-10 U/mL)과 isotonic fluid (ex. Lactated Ringer's Solution) 주입 예정 (총 용액의 부피 체중의 20% 이내), catheter 삽입 위치는 femoral 또는 jugular의 venous-venous 에 해당함.
- Tail vein 혈액 채취: 동물의 사육케이지에서 restrainer로 이동. 5분 동안 heat lamp나 heat pad등을 이용하여 혈관을 확장시키고 small gauge butterfly needle 등으로 혈액채취. 채취 후에는 거즈 압박을 통해 출혈을 막고 다시 사육케이지로 이동시킬 예정.