국가연구개발 보고서원문 성과물 전담기관인 한국과학기술정보연구원에서 가공·서비스 하는 연구보고서는 동의 없이 상업적 및 기타 영리목적으로 사용할 수 없습니다

[최종보고서 파일 업로드 양식]

중견연구자지원사업 최종보고서

양식A101

① 부처사업명(대)	기초연구사업		보안등급(보안, 일반)	일반
② 사 업 명(중)	중견연구자지원사업		공개가능여부(공개, 비공개)	공개
③ 세부사업명(소)	핵심개인(미래유망, 사회이슈)			
④ 과제성격(기초, 응용, 개발)	기초	④-1 실용화 대상여부(실용화, 비실용화)		비실용화
⑤ 과 제 명	국 문	펄스형 전자기장 자극의 지방분해 영향에 관한 연구		
	영 문	Study on the Pulsed Electromagnetic Fields effect of adipocyte decomposition		
⑥ 주관연구기관	인제대학교			
⑦ 협동연구기관				
⑧ 주관연구책임자	성 명	문치웅	직급(직위)	교수
	소속부서	의용공학부	전 공	전기전자

⑨ 연구개발비 및 참여연구원수 (단위: 천원, M·Y)

년 도	정부출연금 (A)	기업체부담금			정부외 출연금 (B)	상대국 부담금 (F)	합계 G=(A+B+E)	참여 연구원수
		현금 (C)	현물 (D)	소계 E=(C+D)				
1차년도	101,000			0			101,000	4
2차년도	101,000			0			101,000	8
3차년도	101,000			0			101,000	8
4차년도				0			0	
5차년도				0			0	
합계	303,000	0	0	0	0	0	303,000	20

⑩ 총연구기간	2014. 11. 01 - 2017. 10. 31 (36 개월)
⑪ 다년도협약연구기간	기재하지 않음
⑫ 당해연도연구기간	2015.11.01 ~ 2016.10.31 (12개월)

⑬ 참여기업	중소기업수	대기업수	기타	계
				0

⑭ 국제공동연구	상대국연구기관수	상대국연구개발비	상대국연구책임자수

관계 규정과 모든 지시사항을 준수하면서 국가연구개발사업에 따라 수행한 연구개발과제의 최종보고서를 붙임과 같이 제출 합니다.

2017 년 11월 30일

주관연구책임자 : 문 치 웅

주관연구기관장 : 홍 승 철

※ 전자접수이므로 주관연구책임자 및 주관연구기관장 서명(인, 직인)은 생략

국가연구개발 보고서원문 성과물 전담기관인 한국과학기술정보연구원에서 가공·서비스 하는 연구보고서는 동의 없이 상업적 및 기타 영리목적으로 사용할 수 없습니다

〈 목 차 〉

Ⅰ. 연구계획 요약문

1. 국문요약문 ····· 3

Ⅱ. 연구결과 요약문

1. 국문요약문 ····· 4
2. 영문요약문 ····· 5

Ⅲ. 연구내용

1. 연구개발과제의개요 ····· 6
2. 국내외 기술개발 현황 ····· 8
3. 연구수행 내용 및 결과 ····· 10
4. 목표달성도 및 관련분야에의 기여도 ····· 77
5. 연구결과의 활용계획 ····· 81
6. 연구과정에서 수집한 해외과학기술정보 ····· 81
7. 주관연구책임자 대표적 연구실적 ····· 91
8. 참고문헌 ····· 91
9. 연구성과 ····· 93
10. 국가과학기술지식정보서비스에 등록한 연구시설·장비 현황
11. 연구개발과제 수행에 따른 연구실 등의 안전조치 이행실적
12. 기타사항 ····· 95

국가연구개발 보고서원문 성과물 전담기관인 한국과학기술정보연구원에서 가공·서비스 하는 연구보고서는 동의 없이 상업적 및 기타 영리목적으로 사용할 수 없습니다

〈 연구계획 요약문 〉

양식A201

연구의 목적	▪ 펄스형 전자기장 자극 시스템 (Pulsed electromagnetic fields stimulation system)을 개발하여 전자기장 자극에 따른 최적화된 지방분해 자극법 확립 ▪ 펄스형 전자기장에 의한 지방세포 및 조직의 대사물질 변화를 자기공명분광(magnetic resonance spectroscopy)를 이용하여 비침습적으로 관찰 가능한 최적화된 프로토콜을 확립.
연구내용	▪ 펄스형 전자기장 자극 시스템 • 컴퓨터 모의실험: 복합적인 물성치 및 전자기장 해석 시스템인 SEMCAD X 이용 • 최적의 자기장을 형성하기 위한 코일 조건을 설정하기 위해 다양한 변수들을 실험적으로 적용하여 프로토 타입의 코일 설계 • 코일 형태, 코일 두께, 코일 선재, 코일 회전수, 코일과 자극부위와의 거리, 인가전압, 전자기장의 강도 등의 변수 적용 • 전자기장 발생 시스템 프로토 타입 제작 ▪ 펄스형 전자기장 자극 시스템 적용 • 지방세포 및 조직을 이용한 생물학적 분석: 지방분해 효과 확인 • 펄스형 전자기장 자극: 자극 주파수, 자극 시간, 자극 주기에 따른 변수 조절 ▪ 자기공명분광(magnetic resonance spectroscopy: MRS)을 이용한 지방 분해 신호 획득 프로토콜 확립 • 지방세포의 3차원 배양과 지방 조직 배양을 이용하여 지방 분해 효과 측정 • 신호 획득: 임상용 MRI와 500MHz NMR 장치. ▪ 펄스형 전자기장에 의한 세포 반응 평가 • MRS 평가 : TSP, DDS와 같은 기준물질을 적용한 정량적 평가. • 생화학적 평가 : 염색, DNA 정량, RT-PCR, 세포 괴사 및 고사 측정
연구내용의 활용계획 (기대효과)	▪ 생체의 지방분해 효과를 극대화 할 수 있는 펄스형 전자기장 자극법의 최적화 ▪ 세포 대사물질 분광 분석을 통해 지방세포 분해 과정에서의 바이오 마커 기준 제시 ▪ 부위별 비만 치료에 적용할 수 있는 전자기장 자극 프로토콜을 세포수준의 자극 기술로 확보 ▪ 자기공명분광을 이용한 비침습적이고 반복적인 세포 신호의 획득으로 신뢰성 있는 세포 상태 정량화 방법 제시 ▪ 세포 대사물질 측정 결과를 바탕으로 심부 조직의 전자기장 치료법 제시

중심어			
	자기공명분광	비만	지방세포
	펄스형 전자기장	컴퓨터 모의실험	

국가연구개발 보고서원문 성과물 전담기관인 한국과학기술정보연구원에서 가공·서비스 하는 연구보고서는 동의 없이 상업적 및 기타 영리목적으로 사용할 수 없습니다

〈 연구결과 요약문 〉

〈한글요약문〉

양식A202

연구의 목적 및 내용	▪ 펄스형 전자기장 자극 시스템 (Pulsed electromagnetic fields stimulation system)을 개발하여 전자기장 자극에 따른 최적화된 지방분해 자극법 확립 ▪ 펄스형 전자기장에 의한 지방세포 및 조직의 대사물질 변화를 자기공명분광(magnetic resonance spectroscopy)를 이용하여 비침습적으로 관찰 가능한 최적화된 프로토콜을 확립.
연구결과	▪ 세포 자극 펄스형 자기자극을 줄 수 있는 장치 (PEMF) 개발 ▫ 최적 자기장 발생 코일에 대한 컴퓨터 모의실험 - Sim4Life v2.0 (SPEAG, Swiss)를 이용한 전자기장 발생 모의실험 - 복수 코일을 이용한 효율적 전자기장 시스템 개발 ▪ 개발된 펄스형 전자기장 발생 시스템 평가: 자극기 효과 검증 ▫ 개발된 PEMF 자극기의 세포에의 적용: PEMF 자극의 연골세포 증식효과 확인(P<0.05) ▪ 펄스형 자기자극 (PEMF) 장치의 세포자극 신뢰성 확보 및 검증 ▫ 연골세포에서의 변화 관찰: 자극 주파수와 자장세기를 조절하여 세포 증식에 미치는 영향 확인 ✓ PEMF 자극군의 세포 증식이 대조군에 비해 활발한 것을 확인 ▫ 지방세포 및 지방 분화 줄기세포와 지방 조직(공배양세포)과 줄기세포 분화 시 변화 관찰: 지방분화 억제에 대한 전자기장 자극의 효과 확인 ▪ 펄스형 자기자극 (PEMF) 장치의 시스템 및 코일 최적화 ▫ 기존 회로에서의 다이오드 소자 변경 ▫ 열에 의한 자극을 최소화 하기 위해 코일 하우징 및 쿨링 시스템 도입 ▪ 펄스형 자기자극 (PEMF) 장치의 세포자극 신뢰성 확보 및 검증 ▫ 지방분화배지를 이용한 지방분화 시 PEMF 자극을 주어 지방분화 억제 효과 확인 ▫ 자극 프로토콜의 변수 중 10분 자극과 10Hz에서 줄기세포의 지방분화 억제 효과가 유의미한 것으로 확인함 (P<0.05) ▪ 최적화된 자극 방법에 의한 세포 및 조직의 대사물질 정량 분석: 자기공명분광법 시행 ▫ 지방전구세포의 지방 분화 시 PEMF 자극의 효과를 NMR 측정을 통하여 확인 ▫ NMR 스펙트럼을 이용한 대사물질 정량화 결과 또한 골수유래 줄기세포의 지방 분화 억제 경향과 마찬가지로 자극 프로토콜의 변수 중 10분 자극과 10Hz에서 줄기세포의 지방분화 억제 효과가 유의미한 것으로 확인함
연구결과의 활용계획	▪ 전자기장 자극 조건 조절 가능한 범용 펄스형 전자기장 자극 장치 H/W 및 프로토콜 개발 ▪ 세포 대사물질 분광 분석을 통해 지방세포 억제 과정에서의 바이오 마커 기준 제시 ▪ 부위별 비만 치료에 적용할 수 있는 전자기장 자극 프로토콜을 세포수준의 자극 기술로 확보 ▪ 자기공명분광을 이용한 비침습적이고 반복적인 세포 신호의 획득으로 신뢰성 있는 세포 상태 정량화 방법 제시 ▪ 세포 대사물질 측정 결과를 바탕으로 심부 조직의 전자기장 치료법 제시

중심어			
	자기공명분광	비만	지방세포
	펄스형 전자기장	컴퓨터 모의실험	지방 분화 억제
	세포 대사물질		

국가연구개발 보고서원문 성과물 전담기관인 한국과학기술정보연구원에서 가공·서비스 하는 연구보고서는 동의 없이 상업적 및 기타 영리목적으로 사용할 수 없습니다

〈 SUMMARY 〉

양식A203

Purpose& contents	▪ Establishment of optimized adipolysis stimulation method with electromagnetic field stimulation through developing pulsed electromagnetic fields stimulation system ▪ Establishment of an optimized protocol for non-invasive measurement of the metabolite changes of adipocyte and tissues by pulsed electromagnetic fields unsing (nuclear) magnetic resonance spectroscopy
Result	▪ To develop a PEMF stimulation system capable of stimulating cells with pulsed electromagnetic field ▫ Computer simulation of PEMF coils generating optimal electromagnetic fields - Simulation for generating the electromagnetic field with Sim4Life v2.0 (SPEAG, Swiss) - Multiple coile design to efficiently generate electromagnetic field ▪ Evaluation of the developed PEMF system : verification of stimulator performance ▫ Application of developed PEMF stimulator to cells : Confirming the effect of PEMF stimuation on chondrocyte proliferation ($p<0.05$) ▪ Reliability and validation of the PEMF cell stimulator system ▫ Monitoring chondrocyte changes : Effect of stimulation frequency and magnetic fields strength on cells proliferation ✓ It was confirmed that cell proliferation in the PEMF stimulation group was more active than in the control group ▫ Investigation of changes in co-cultured cells of adipocytes, adipose differentiated stem cells and adipose tissue and stem cell differentiation : Identification of the PEMF stimulation on lipid differentiation inhibition ▪ System and coil optimization of PEMF devices ▫ A diode element was relpalced in power circuit board ▫ Reinforcement of the coil housing and cooling system to minimize heat stimulation effects ▪ Confirmation and verification of cell stimulation reliability of PEMF system ▫ Identification of inhibition effect of adipogenic differentiation by PEMF stimulation during fat differentiation ▫ It was confirmed that the effect of 10-min and 10-Hz stimulation protocol on the lipid differentiation of stem cells was significant ($p<0.05$) ▪ Quantitative analysis of cell and tissue metabolites for optimized stimulation method ▫ PEMF stimulation effects on adipogenic differentiation of lipid precursor cells was confirmed by NMR measurement ▫ As a result of metabolite quantification using NMR spectroscopy, it was confirmed that the 10 min stimulation of the stimulation protocol and the lipid differentiation inhibition effect of the stem cells at 10 Hz were significant as well as the tendency of inhibiting lipid differentiation of bone marrow stem cells
Expected Contribution	▪ Development of universal PEMF cell stimulator with adjustable electromagnetic field conditions ▪ Suggesting biomarker criteria in the process of inhibiting adipocytes through spectrometric analysis of cellular metabolites ▪ Obtain the electromagnetic field stimulation protocol applicable to the treatment of obesity according to the site by the stimulation technology at the cell level ▪ Non-invasive and repetitive cell signal acquisition using MRS to provide a reliable quantification method of cell state ▪ Based on the results of cell metabolism measurement, EM treatment of deep tissue can be possible

Keywords			
	Magnetic resonance spectroscopy	Obesity	Adipocyte
	Pulsed electromagnetic fields	Computer simulation	Adipogenic differentiation inhibition
	Cell metabolite		

국가연구개발 보고서원문 성과물 전담기관인 한국과학기술정보연구원에서 가공·서비스 하는 연구보고서는 동의 없이 상업적 및 기타 영리목적으로 사용할 수 없습니다

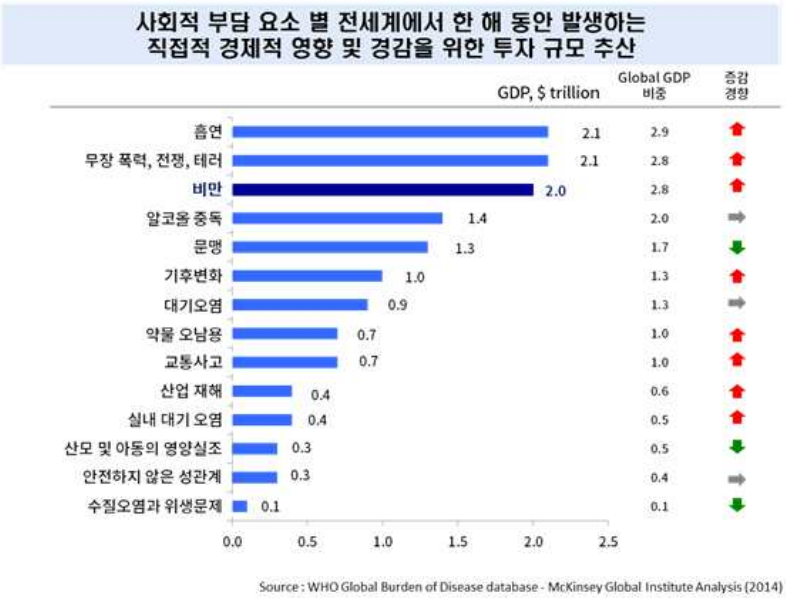
〈 연구내용 및 결과 〉

1. 연구개발과제의 개요

가. 연구배경

1.1.1. (1) 비만

- 비만은 당뇨, 고혈압, 관상동맥질환, 뇌졸중 등 만성질환과 더불어 심장 및 폐질환 등 많은 질병을 유발시켜 국민의 건강을 위협하며, 비만도가 40% 이상인 성인에서 중풍, 심장질환, 소화기질환에 의한 사망률이 크게 증가함
- 2015 국민건강영양조사에 의하면 우리나라 만 19세 이상 성인 비만율(체질량지수 25 kg/m2 이상)은 33.2%(남자 39.7%, 여자 26%)로 지난 2005년 31.3, 2010년 30.9%, 2013년 31.8%와 비교해 매년 증가하는 추세임[1]
- 세계보건기구(WHO)에 따르면 비만으로 인해 한 해 동안 전 세계적으로 발생하는 사회적 비용은 2조 달러로 집계되고, 우리나라의 경우 비만으로 인한 국내 사회·경제적 비용은 2005년 기준 약 1조 8천억 원, 2013년 기준 약 6조 7천억 원으로 추계되며, 현재 비만 유병율의 증가 추세에 따라 향후 지출될 사회·경제적 비용 부담 또한 지속적으로 증가할 것으로 예상됨[2-4]



<그림 1. 사회적 부담 요소 별 투자규모에 대한 통계자료 >

- 이에 따라 각국 정부에서는 적극적인 비만 예방 대책을 마련하고 있으며 더불어 비만 치료 산업도 성장 중임
- 비만 치료에는 크게 수술적 치료와 비수술적 치료로 나눌 수 있는데, 최근 비만치료제와 수술에 대한 부작용이 대두되면서 안전하고 부작용이 적은 비수술적 기계요법에 의한 지방 분해술이 각광받고 있음
- 지방흡입술이나 위절제술 등과 같은 수술적 치료는 시각적인 변화가 확연히 나타나는 방법이나 사망사례 보고 등의 단점이 있음

국가연구개발 보고서원문 성과물 전담기관인 한국과학기술정보연구원에서 가공·서비스 하는 연구보고서는 동의 없이 상업적 및 기타 영리목적으로 사용할 수 없습니다

(2) 펄스형 전자기장 치료

- 현대의료에 있어 자기장은 자기공명영상장치와 같은 진단 기기에서부터 경두개 자기자극과 같은 치료에 적용되는 장치까지 매우 다양한 방법으로 사용되고 있는데, 특히 자기장 치료는 부상이나 통증과 염증의 원인에 대해 비침습적이고 안전하며 전기생리학적인 기전에 의한 치료 효과를 제공해주는 것으로 알려져 있음
- 자기장 치료는 여러 연구에 의해 통증 질환(요통, 경부통, 대상포진 후 신경통, 골반통, 신경병성 통증, 성형외과적 만성통증), 염증질환(슬관절염, 다발성 경화증), 견관절 질환 등에도 적용되었으며, 창상치유, 골재생, 연골재생 등에도 적용되었음
- 이렇듯, 전자기장 자극 치료는 다양한 임상에서 적용되고 있는 기술이지만 최근 비만 치료 연구에 적용되고 있지만 아직 기초 단계에 머물러 있음
- 또한, 현재까지 수행된 자기장과 관련된 연구들은 표적의 위치, 자기장의 세기, 자극 주파수, 자극시간 등이 설계한 연구에 따라 제각각이었으며, 자기장 자극 시스템에 대한 검증을 하지 않아 자기장에 의해 발현되는 효과를 정량화하는데 한계점을 가지고 있음

1.1.2. (3) 자기공명분광

- 핵자기공명(Nuclear Mmagnetic Resonance; NMR) 또는 자기공명분광(Magnetic Resonance Spectroscopy; MRS)은 화합물의 구조 및 성분을 규명할 수 있는 강력한 도구로써, 세포내 대사물질을 관찰하여 세포 활동을 규명하고자 하는 연구가 다년에 걸쳐 진행되고 있음[5-7]
- 하지만, 대부분의 자기공명분광 연구에서는 세포 추출(Cell extraction) 방법을 적용하거나 HR-MAS 등의 고체 자기공명분광법으로 대사물질의 변화를 측정하므로 자기공명 측정방법의 비침습적인 강점을 충분히 활용하지 못하는 실정임

나. 필요성 및 목적

- 해마다 비만율은 증가하는 추세지만 현재 시행되고 있는 비만 치료법들은 치료효과에 대한 신뢰성과 안전성이 낮은 문제점이 존재
- 현재까지 알려진 비수술적 비만치료 방법들은 단기간 내 일시적 체중 감량을 유도할 수 있지만, 대부분 다시 체중증가가 발생하기 때문에 수술 외에 다른 근본적 치료 방법이 전무한 상태임
- 비만의 사후 치료에는 상당한 시간과 비용이 들며, 재발률이 높은 질병이므로 사전예방의 중요성이 대두됨
- 따라서, 본 연구는 지방전구세포 및 줄기세포의 지방분화 억제에 초점을 두어 사전 비만 예방에 도움을 주고자 함
- 펄스형 전자기장은 자극 프로토콜마다 효과를 나타내는 적용 부위 및 나타나는 증상이 다르며, 이와 관련된 기존 연구들에서 정확한 기준을 찾기 어려움
- 세포에 펄스형 전자기장 자극을 적용하는 연구는 활발히 이루어졌으나, 지방세포 및 조직을 이용한 펄스형 전자기장 자극 연구는 미비한 실정임
- 본 연구는 세포 자극에 최적하된 펄스형 전자기장 자극 시스템을 개발하고 지방분화 억제에 효과를 나타내는 전자기장 자극 프로토콜을 확립하고자 함
- 본 연구에서는 펄스형 전자기장 자극기를 개발하여 지방 분해 및 억제에 대한 최적의 자극조건을 찾고, 자기공명분광을 이용하여 지방세포 분해 시 대사물질의 변화를 정량적으로 측정함으로써 지방분해 및 억제 효과를 판단하고자 함

국가연구개발 보고서원문 성과물 전담기관인 한국과학기술정보연구원에서 가공·서비스 하는 연구보고서는 동의 없이 상업적 및 기타 영리목적으로 사용할 수 없습니다

2. 국내외 기술개발 현황

(1) 비만치료 기술현황

■ 비만 치료는 행동치료, 식이요법, 운동치료, 약물치료, 수술치료 등으로 나뉘는데 약물과 수술에 대한 부작용이 대두 되면서 비만 치료 시장은 라이프 스타일 케어 중심으로 옮겨가는 추세임

▫ 국내 비만 치료제 시장은 2010년에 식욕억제제인 리덕틸이 심혈관계 질환 발생 위험성 문제로 인해 퇴출된 이후로 침체되었음[8]

▫ 2010년 이전의 비만치료제 연구는 효과 측면에 초점을 두었지만 최근에 나오는 비만치료제의 경우 안전한 비만치료제에 대한 수요가 많아지면서 연구 동향도 안전성에 초점을 두고 있음

▫ 수술적 치료 중 위 우회술, 위소매 절제술과 같이 음식섭취량을 줄이거나 영양흡수를 제한하여 체중감소를 유발하는 비만치료법은 지속적인 체중감소가 이루어지고 효과적이지만, 수술 합병증 발생률이 높고 영양소 부족에 대한 지속적인 관리가 필요하다는 단점이 존재[9]

▫ 지방흡입술은 피하지방을 파괴하여 흡입해내 영구적으로 지방세포수를 줄여주므로 체중감량에 효과적이며 살이 다시 찌는 요요현상 발생률이 적지만, 수술 부위가 울퉁불퉁해지거나 수술 흉터 및 멍을 동반하는 부작용 존재[10]

■ 비만 사업이 라이프 스타일 케어 중심으로 옮겨가면서 에스테틱 측면의 비수술적 기계요법이 대두되고 있음

▫ 냉각 지방 분해술은 다른 시술과 비교해서 영구적으로 피하지방 일부 제거가 가능하고 미비한 붓기와 통증 등의 이유로 널리 사용되고 있지만, 시술한 부위가 마취된 듯한 느낌의 '감각 이상' 과 같은 말초신경 손상의 부작용이 존재함[11]

▫ 고주파를 이용한 치료법은 진피층에 열을 발생시켜 지방 세포를 파괴 및 제거하는 방법으로, 이때 발생하는 열이 시술자의 불쾌감을 유발하고 일과성 홍반 및 멍이 생길 수 있음[12]

▫ 이 외에도 레이져, 초음파 등의 많은 비수술적 기계요법들이 존재하지만 적용되는 비만도가 정해져 있거나 복부 비만과 같은 부분 비만에만 효과적임

(2) 펄스형 전자기장 자극기 기술현황

■ 펄스형 전자기장 자극은 인체에 펄스형 자기장을 투과시켜 발생된 생체전류가 세포를 자극시킴으로서 생기는 전기 생리학적인 기전에 의해 인체 각 조직에 다양한 효과를 나타냄[13]

▫ 근육조직의 경우 운동신경에 자극을 주어 근 수축 효과를 나타냄

▫ 세포의 신진대사를 활발히 하여 세포 활성화 및 재생을 촉진하며 염증치료 및 혈액순환에 도움을 주므로, 골관절염과 각종 통증질환 치료에도 쓰임

▫ 또한, 콜라겐 합성과 섬유아세포 활성화를 촉진시켜 주름개선에 활용되기도 함

■ 펄스형 전자기장 치료의 경우 염증치료, 통증 완화, 세포 활성화로 인한 창상치유 효과 등에 대하여 많은 연구가 이루어졌으나 비만에 대한 치료, 즉 인체 내 지방 억제에 대한 연구는 미비한 실정임

■ 현재 임상에서 자기장 단독으로 치료를 위해 사용되는 사례는 대부분 통증완화 이지만, 자기장이 염증치료 및 혈액순환에 도움을 주는 등의 긍정적 영향을 레이져나 초음파와 같은 다른 비침습적 자극과 함께 사용하여 적용되고 있음

▫ 자기장 및 레이져 복합치료기기 (TESLA-3000, weverinstruments, korea)는 심부자극 전자기장 치료

국가연구개발 보고서원문 성과물 전담기관인 한국과학기술정보연구원에서 가공·서비스 하는 연구보고서는 동의 없이 상업적 및 기타 영리목적으로 사용할 수 없습니다

와 레이저치료의 복합 자극기로 통증질환 완화에 사용됨[14]

- ▫ RF 고주파에너지와 펄스형 전자기장을 접목시킨 미국 Venus Concept사의 '비너스 프리즈' 는 고주파와 자기장 에너지를 동시에 피부 속으로 전달하여 열을 발생시킴으로서 셀룰라이트 감소 및 콜라겐 합성을 돕고 엘라스틴 섬유의 생산을 일으켜 주름감소와 피부탄력 도움에 사용됨[15]

■ 현재 연속적인 전자기장 자극이 치료 부위의 줄기세포가 골분화와 지방분화에 어떠한 효과를 나타내는지에 관한 연구들이 진행 중[16]

■ 펄스형 전자기장 자극 프로토콜마다 효과를 나타내는 적용 부위 및 나타나는 증상이 다름

- ▫ 기니피그의 전신에 10가지 다른 자기장을 적용한 연구에서 혈액 응고와 항 응고효과가 각기 다른 자극 프로토콜에서 나타났음

☞ 지방분화 억제에 효과를 나타내는 전자기장 자극 프로토콜의 확립이 필요함

국가연구개발 보고서원문 성과물 전담기관인 한국과학기술정보연구원에서 가공·서비스 하는 연구보고서는 동의 없이 상업적 및 기타 영리목적으로 사용할 수 없습니다

3. 연구수행 내용 및 결과

가. 1차년도

1차년도 목표	세포 및 조직에 효과적으로 적용 가능한 펄스형 전자기장 시스템 개발 및 자극 프로토콜 개발을 위한 기틀 마련

■ 컴퓨터 모의실험을 통한 펄스형 전자기장 발생장치 구성 및 시스템 개발

■ 펄스형 전자기장 (PEMF)에 의한 타겟팅 대상 (세포시료)에 따른 자장 분석 모의실험
■ 세포시료의 자기장 자극에 효과적인 전자기장 발생을 위한 코일 형태 결정
■ 전자기장 구동 시스템 전원 및 하드웨어 개발
■ 제작된 펄스형 전자기장 시스템을 이용한 시스템 검증

※ 여러 형태로 생체 조직에 영향을 미치고 있는 것으로 알려진 펄스형 자기자극 (PEMF)을 세포 수준에서 확인하고자 함

■ 세포 펄스형 자기자극을 줄 수 있는 장치 (PEMF) 개발
  ▫ 최적 자기장 발생 코일에 대한 컴퓨터 모의실험
    - Sim4Life v2.0 (SPEAG, Swiss)를 이용한 전자기장 발생 모의실험
      ✓ 유한요소 해석을 통한 시스템 변수 조절
        - 최적의 전자기장을 생성하기 위해 코일 형태 결정
        - 전자기장의 세기 및 진폭에 따른 펄스 집속 형태 또는 펄스 방사 범위 설정
        - 컴퓨터 모의실험 상에서 지방세포의 물성치와 동일하게 설정하여 오차 최소화
    - 복수 코일을 이용한 효율적 전자기장 시스템 개발
      ✓ 컴퓨터 모의실험 결과를 기초로 하여 여러 형태의 코일 제작
      ✓ 펄스형 전자기장 자극 시스템 프로토 타입 제작
      ✓ 시스템 interface : 정합, 동조, 디커플링 회로 구성
        - 광범위 자극 및 집속 자극이 가능한 멀티 코일 설계 및 시뮬레이션
■ 개발된 펄스형 전자기장 발생 시스템 평가: 자극기 효과 검증
  ▫ 개발된 PEMF 자극기를 세포에 적용
    - 타겟세포: 연골세포 ▸ 세포 증식 확인
      ✓ PEMF 자극의 연골세포 증식효과 확인 ($P<0.05$)

---

(1) 세포 자극 PEMF 장치 개발

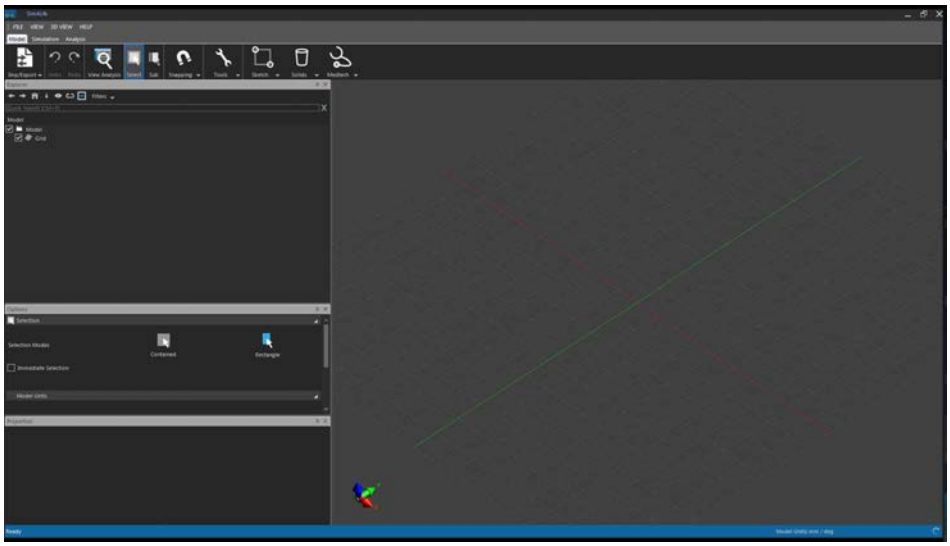
■ **PEMF 자극기 제작 전 세포 실험에 최적화된 코일 사이즈와 형태를 결정하기 위해 컴퓨터 모의실험 수행**
■ **확정된 coil 형태를 기준으로 PEMF 회로와 시스템 인터페이스 설계**

국가연구개발 보고서원문 성과물 전담기관인 한국과학기술정보연구원에서 가공·서비스 하는 연구보고서는 동의 없이 상업적 및 기타 영리목적으로 사용할 수 없습니다

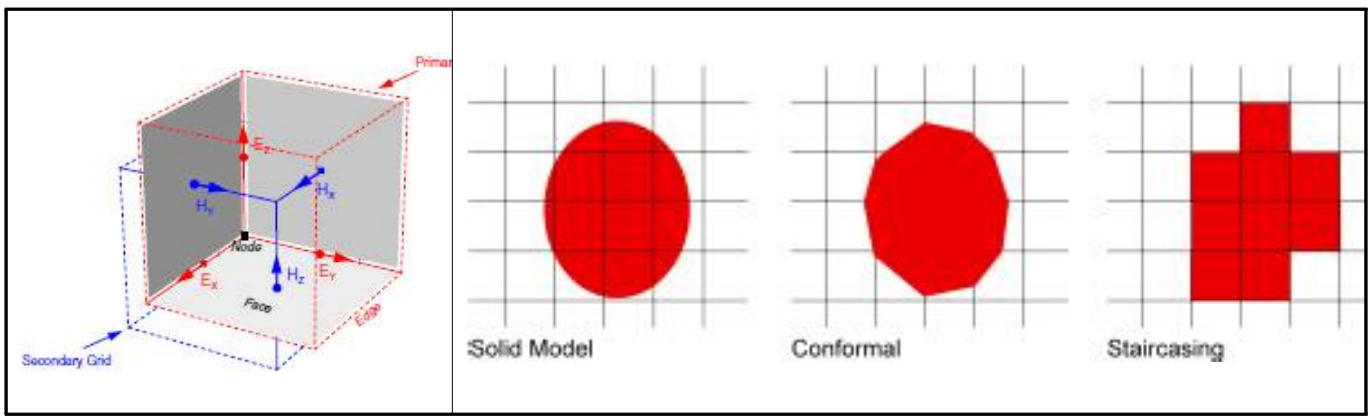
1) 연구 방법

① Sim4Life v2.0 (SPEAG, Swiss)를 이용한 전자기장 발생 모의실험

- 유한차분 시간영역법(FDTD : Finite Difference Time Domain) 방법을 이용
- 전자기파가 공간이나 매질 내에서 전파되는 것을 확인하기 위하여 맥스웰 방정식을 이용
- 전자기장 발생장치 제작을 위해서는 저주파에서의 전자기장 해석이 필요하며 이를 위해 맥스웰의 컬 방정식으로 해석하는 Low Frequency Solver를 이용
  - Low Frequency Solver type은 Biot-Savart 법칙을 적용하는 Magneto quasi-static을 사용
  - 아래의 그림은 Sim4Life의 전자기장 시뮬레이션을 위한 격자(Grid) 모양과 해석 시 사용하는 근사 모델링 형태를 나타냄 → Conformal 모델 사용



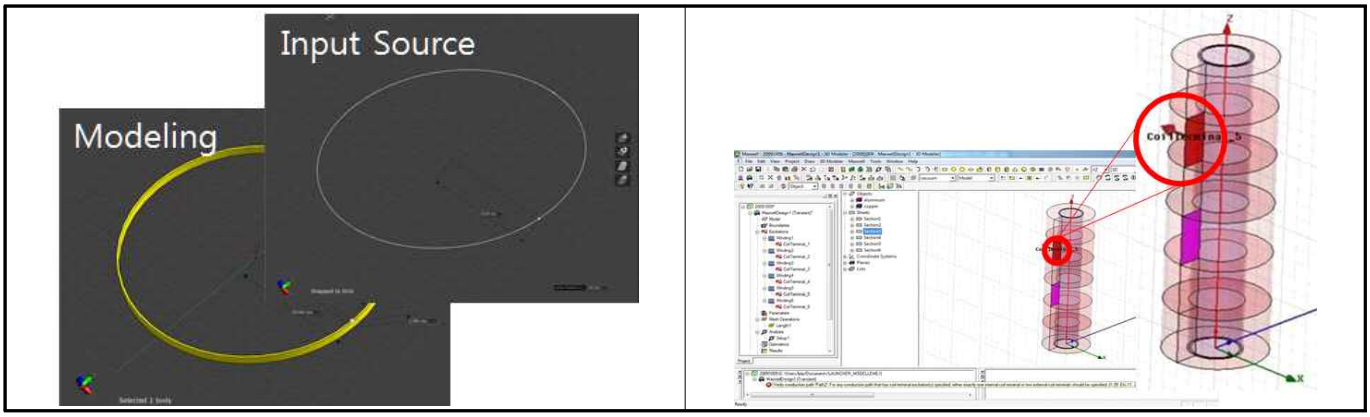
<그림 2. Sim4Life GUI>



<그림 3. 시뮬레이션 격자 모양(좌), 근사 모델링 형태(우)>

국가연구개발 보고서원문 성과물 전담기관인 한국과학기술정보연구원에서 가공·서비스 하는 연구보고서는 동의 없이 상업적 및 기타 영리목적으로 사용할 수 없습니다

■ 선(Line)을 입력전원으로 이용하여 해석함



<그림 4. 시뮬레이션 입력전원의 차이, Sim4Life(좌), Maxwell3D(우)>

② 코일을 이용한 효율적 전자기장 시스템 개발

■ 컴퓨터 모의실험 결과를 기초로 하여 여러 형태의 코일 제작

▫ 자기유도 코일 프로브 설계

- 시변자기장을 발생시키기 위해 사용하는 코일은 Pan형의 솔레노이드의 형태를 고려함
- 이 코일의 길이를 l, 안쪽 반경을 R_1, 바깥쪽의 반경을 R_2, 권선수를 n이라고 할 때, 이 코일의 저항성분 R 은

$$R=(\frac{\rho nl}{r^2})(R_2^2-R_1^2) \qquad \text{식(1)}$$

- r: 코일 반경, ρ: 코일선 고유저항 (구리선: $\rho = 1.7\times10^{-8}\Omega m$)
- 낮은 주파수에서 작은 권선수의 인덕턴스 L을 근사적 수식으로 표현하면 식(2)와 같음

$$L=\frac{1}{2.54}\frac{0.8R_0^2N^2}{6R_0+9l+10(R_2-R_1)} \qquad \text{식(2)}$$

R_0: 코일 평균 반지름,, N: 권선수, L: 인덕턴스 [μH]

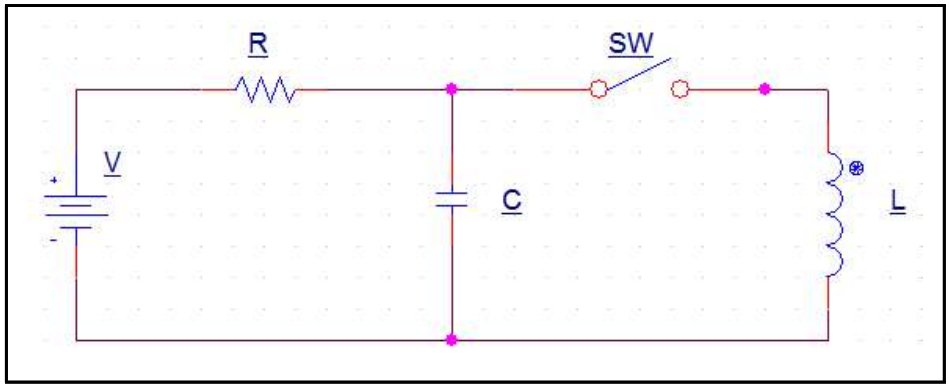
▫ 자기유도 코일 프로브 제작

- 본 과제에서는 시뮬레이션을 통해 획득한 최적의 구조를 이용하여 시스템에 적합한 형태의 자기유도 코일 프로브를 제작함

■ 펄스형 전자기장 자극 시스템 프로토 타입 제작

▫ 시변 펄스형 자기장 발생용 장치 설계

국가연구개발 보고서원문 성과물 전담기관인 한국과학기술정보연구원에서 가공·서비스 하는 연구보고서는 동의 없이 상업적 및 기타 영리목적으로 사용할 수 없습니다



<그림 5. 자기장 발생장치 등가회로>

- 위 그림과 같은 등가회로에서 전원 V에 의해 DC 충전된 캐패시터 C는 자기유도 코일 프루브 내의 인덕턴스와 같이 폐회로를 구성 될 때 C에 충전된 용량성 에너지 $\frac{1}{2}CV^2$가 유도성 에너지 $\frac{1}{2}LI^2$로 이동되어 유도 자기장을 형성함
- 회로의 한주기에 필요한 최소시간 τ는

$$\tau = 2\pi\sqrt{LC} \qquad \text{식(3)}$$

- SCR로 이루어진 SW가 도통되어 캐패시터 C에 저장된 에너지가 코일로 방전될 때, 흐르는 순시전류 $i(t)$는

$$i(t) = \frac{V}{(\omega L)e^{(-Rt/2L)}\sin\omega t} \qquad \text{식(4)}$$

- 여기서, V는 충전전압(V), L은 자기유도코일 프루브의 인덕턴스(H), R은 전체 저항(Ω), ω는 공진 각주파수이고, C는 충전부 캐패시터의 캐패시턴스(F)임

$$\omega = (1/LC - R^2/4L^2)^{1/2} \qquad \text{식(5)}$$

- 코일에서의 전류는 t_0 시점에서 최대가 되고 이때 코일에 흐르는 전류 i_0는

$$i_0 = V(\frac{C}{L})^{\frac{1}{2}} e^{(\frac{-R}{2L\omega} tan^{-1}\frac{2L\omega}{R})} \qquad \text{식(6)}$$

- 이 때의 시간 t_0 는

$$t_0 = (\frac{1}{\omega})\tan^{-1}(\frac{2L\omega}{R}) \qquad \text{식(7)}$$

- 한 펄스 주기 동안 자기유도코일에서 소비되는 에너지 E는

$$E = \int_0^t i(t)^2 R dt \qquad \text{식(8)}$$

- 평균전력은 에너지량을 펄스반복시간 T_r로 나눔으로써 얻어짐, 평균전력 P는

$$P = \frac{1}{2T_r}CV^2(1 - e^{\frac{-RT_r}{L}}) \qquad \text{식(9)}$$

- 캐패시터 C에 필요한 충전시간 t_r은

$$t_r = -RC\ln(1 - \frac{V}{V_0}) \qquad \text{식(10)}$$

- 여기서 V는 충전전압, V_0는 전력공급전압임

국가연구개발 보고서원문 성과물 전담기관인 한국과학기술정보연구원에서 가공·서비스 하는 연구보고서는 동의 없이 상업적 및 기타 영리목적으로 사용할 수 없습니다

③ 개발된 펄스형 전자기장 발생 시스템 평가

■ 자기장의 자극 주파수 및 진폭 조절 성능 평가

▫ 세포자극 시에 필요한 시변자장의 변화를 발생하기 위한 전자기장의 주파수 및 진폭 조절의 정확성 확인

■ 자기장 발생 코일 내부에는 균일한 자장이 형성되어 시료에 일정한 자극이 인가되어야 함, 일정한 공간 내부의 자장을 측정하기 위해 구리선을 이용한 픽업코일을 이용하여 내부의 자장을 측정하였음

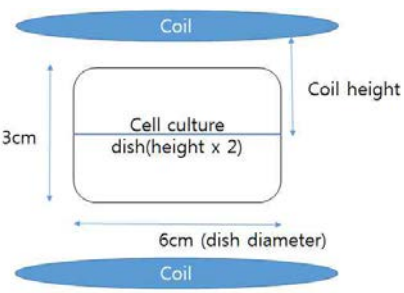
2) 연구 결과

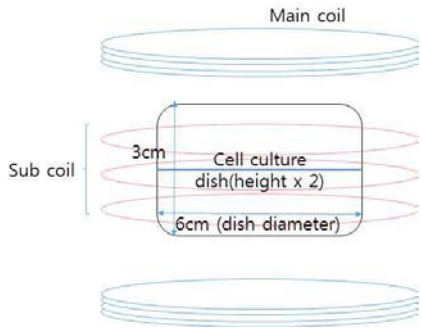
① Sim4Life v2.0 (SPEAG, Swiss)를 이용한 전자기장 발생 모의실험

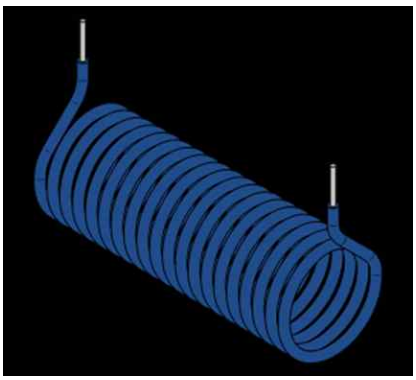
■ **세포 시료의 크기 내에 균일한 자장 (50~100mT) 형성**을 위한 크기 (코일 권선수)와 형태 (권선수 증가에 따른 방향) 고려

■ 저주파 해석이 용이한 Magneto quasi-static 분석 적용하여 주파수 100Hz로 해석함 [Sim4Life TMS (Transcranial magnetic stimulation) simulation tutorial 참조]

■ 아래 그림 6과 같은 형태로 자기장 발생 프로브의 디자인을 구성하였으며, Type 1, 2, 3과 같은 구조의 차이에 의한 자장 필드의 변화를 확인하여 세포 자극 시 균일한 자장을 만들 수 있는 최적의 형태를 구현하고자 함







<Type 1>	<Type 2>	<Type 3>

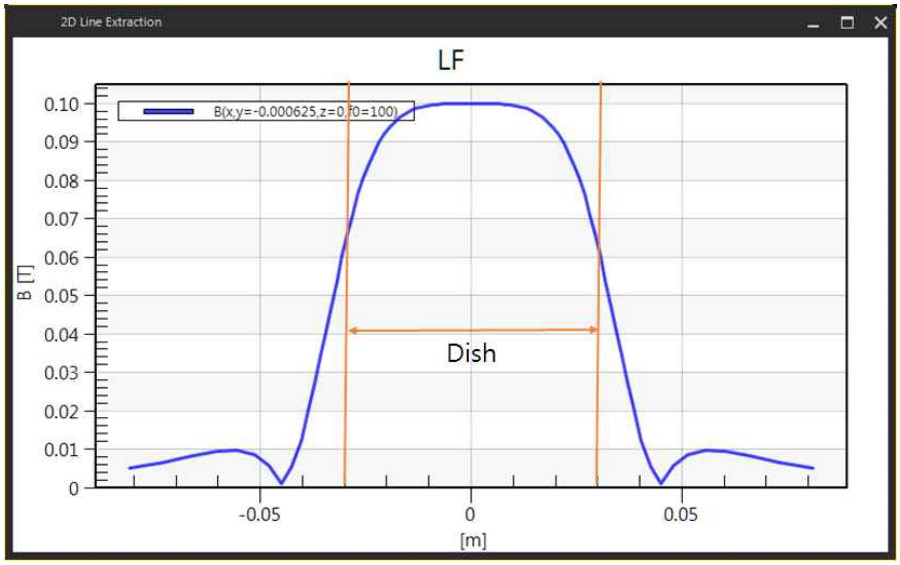
<그림 6. 자기장 발생 프루브 모식도>

■ 시료 내 자장의 균일도를 확인하기 위하여 시료의 중앙을 통과하는 선을 추출하여 자계분포의 평균값 및 표준편차를 산출하였음

▫ 세포 시료가 위치할 부분의 자기장의 세기 측정 (평균, 표준편차)

- 측정구간 (그래프 상의 Dish가 위치할 영역의 자기장세기 값)

국가연구개발 보고서원문 성과물 전담기관인 한국과학기술정보연구원에서 가공·서비스 하는 연구보고서는 동의 없이 상업적 및 기타 영리목적으로 사용할 수 없습니다



<그림 7. 시료 내 자장분포 측정 데이터 획득 구간>

■ 팬형의 솔레노이드 자기유도코일 프로브 ***(디스크 형태, Type 1)***

▫ 4 well-plate의 세포 시료 크기 (60 mm × 60 mm)를 고려하여 시물레이션 초기 값 설정
- 균일한 자장이 형성되어야 할 영역을 4 well-plate 지름 60mm로 설정, 코일의 내부 지름 초기 값 70 mm로 설정 후 안 쪽 (IN) 또는 바깥 쪽 (OUT)으로 권선 수 증가 시켜 자장분포 관찰

▫ 시물레이션 상에서 100 mT에 가까운 균일한 자장을 형성하도록 전류원의 값을 조절하였음
- 권선 수의 증가에 따라 낮은 전류원의 값에도 높은 자장이 형성되는 것을 확인하였으며 균일한 자장이 형성되는 범위도 증가하는 것을 확인하였음

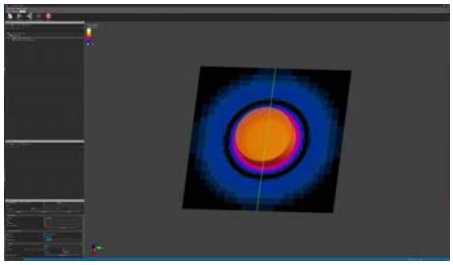
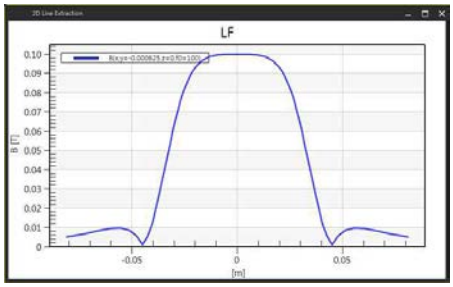
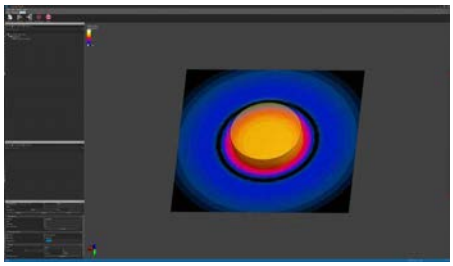
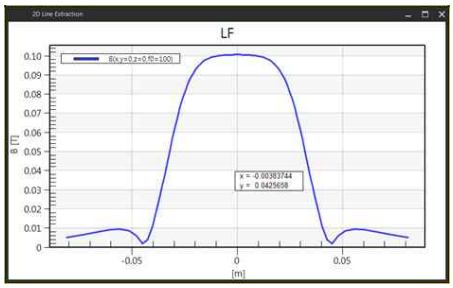
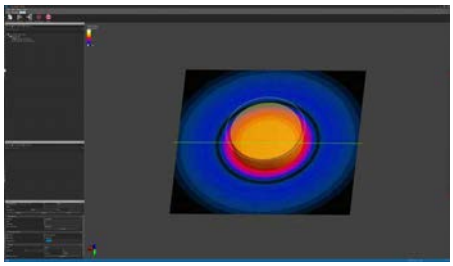
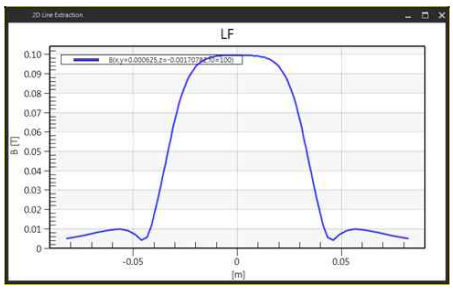
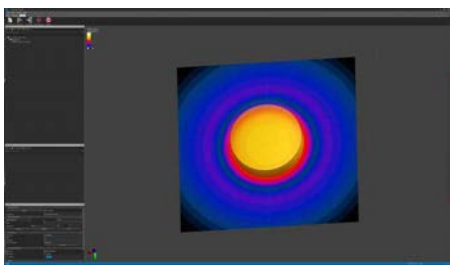
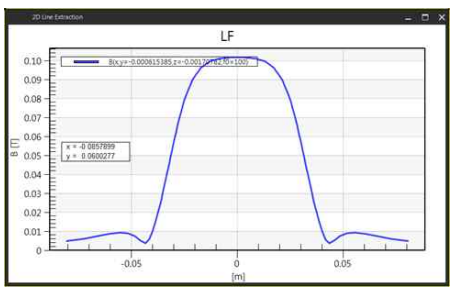
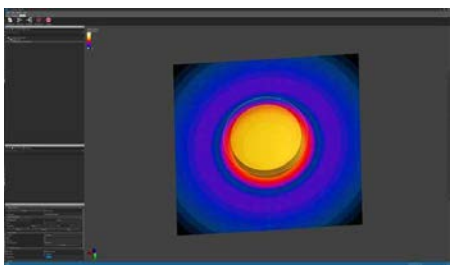
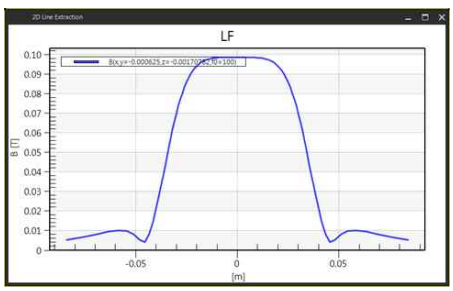
▫ 권선 수, 코일형태에 따른 자계 분포 (2D color map, 시편의 중앙을 통과하는 선을 따라 분포하는 자기장의 세기, IN : 코일 초기 지름 70 mm에서 안쪽으로 코일 감음, OUT : 코일 초기 지름 70 mm에서 바깥 쪽으로 코일 감음)

▫ 시물레이션 결과 안쪽 방향으로 증가하는 형태보다는 세포 시료의 위치 바깥 방향으로 증가하는 형태로 코일을 제작 하는 것이 적합

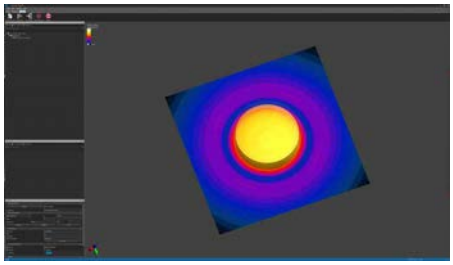
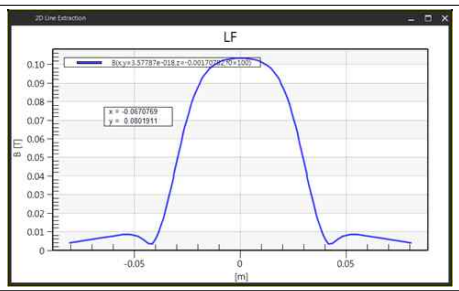
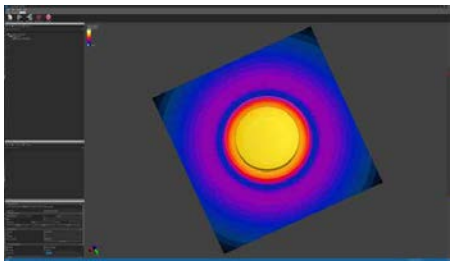
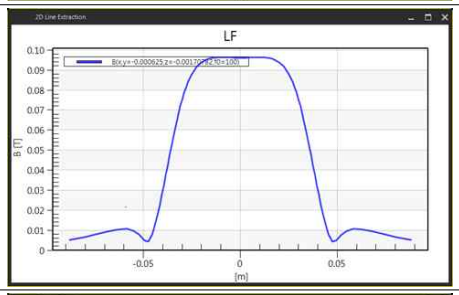
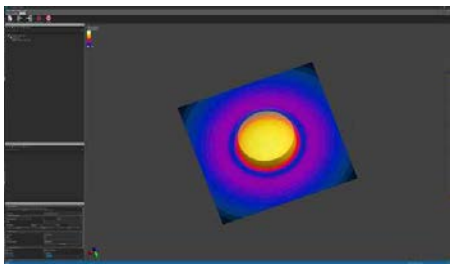
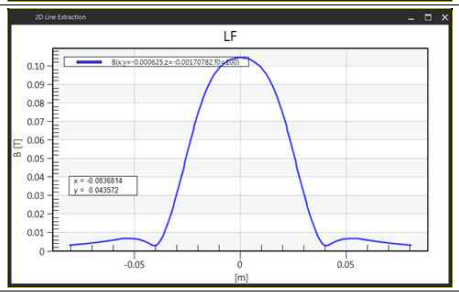
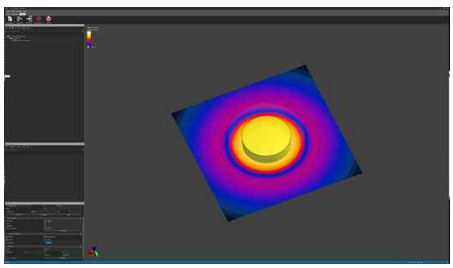
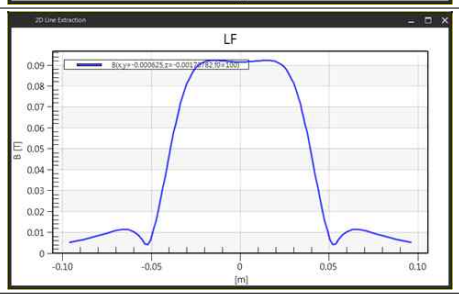
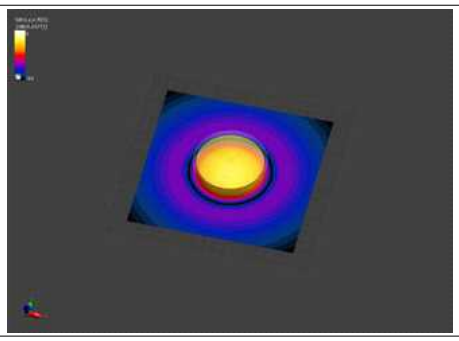
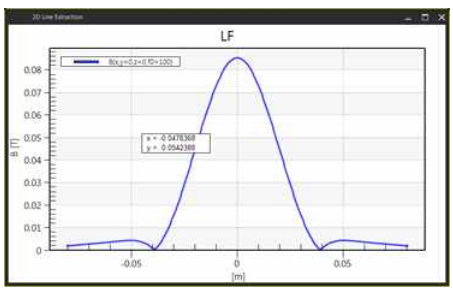
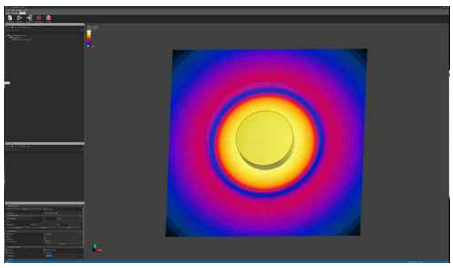
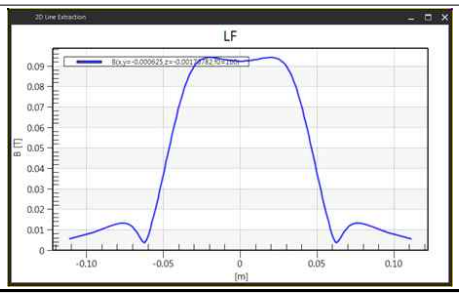
▫ 코일의 권선수가 증가할수록 시료 내부의 자기장의 균일도는 증가하는 것으로 보이나 일정 수 이상 증가 시에 시료 중앙의 자기장의 세기가 감소하는 형태를 보이므로 **Type 1 형태의 코일은 16~32턴 사이의 코일을 제작하는 것이 적합**함

국가연구개발 보고서원문 성과물 전담기관인 한국과학기술정보연구원에서 가공·서비스 하는 연구보고서는 동의 없이 상업적 및 기타 영리목적으로 사용할 수 없습니다

<표 1. Type 1의 B-field 및 자장분포 그래프>

권선 수	인가전류(A)	B-field (2D color map)	자계분포(중심선)	권선 수 증가방향
1	5600			-
2	2800			IN
	2800			OUT
4	1400			IN
	1400			OUT

국가연구개발 보고서원문 성과물 전담기관인 한국과학기술정보연구원에서 가공·서비스 하는 연구보고서는 동의 없이 상업적 및 기타 영리목적으로 사용할 수 없습니다

권선 수	인가전류(A)	B-field (2D color map)	자계분포(중심선)	권선 수 증가방향
8	700			IN
	700			OUT
16	350			IN
	350			OUT
32	180			IN
	180			OUT

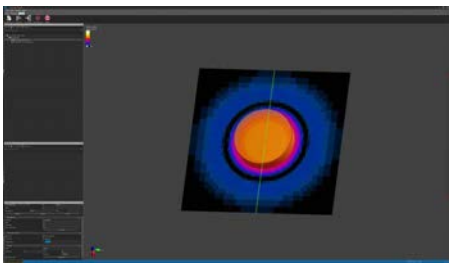
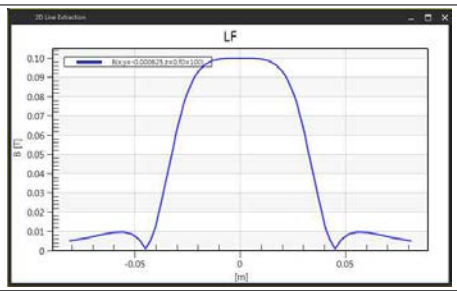
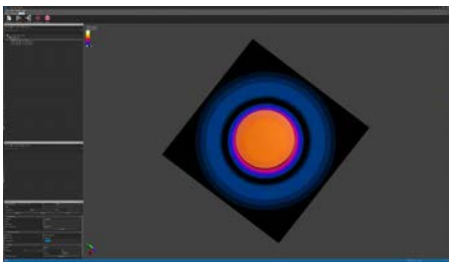
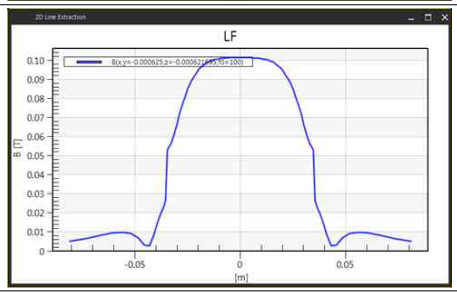
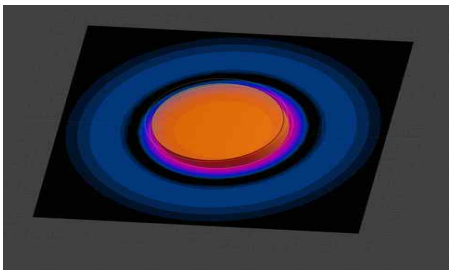
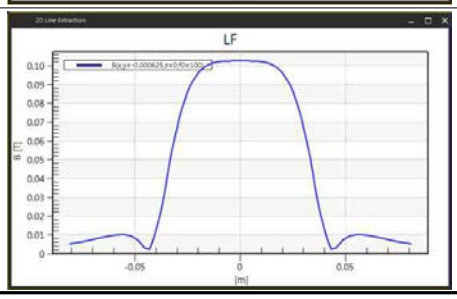
국가연구개발 보고서원문 성과물 전담기관인 한국과학기술정보연구원에서 가공·서비스 하는 연구보고서는 동의 없이 상업적 및 기타 영리목적으로 사용할 수 없습니다

<표 2. Type 1의 평균자장세기 및 표준편차>

권선 수	평균값(mT)	표준편차	방향
1	91.407	11.662	-
2	90.751	12.952	IN
	92.76	9.452	OUT
4	90.231	14.472	IN
	92.923	8.036	OUT
8	84.572	20.019	IN
	92.636	5.729	OUT
16	73.592	24.488	IN
	90.438	2.845	OUT
32	54.994	21.949	IN
	93.149	0.995	OUT

■ 팬형의 솔레노이드 + 하부루프코일 형태의 자기유도코일 프로브 *(디스크 + 하부코일 형태, Type 2)*

<표 3. Type 2의 B-field 및 자장분포 그래프>

권선 수	인가전류(A) Main/Sub	B-field (2D color map)	자계분포(중심선)	비고
1	5600			Type 1
	5600/100			sub 1개
	2800			sub 2개

국가연구개발 보고서원문 성과물 전담기관인 한국과학기술정보연구원에서 가공·서비스 하는 연구보고서는 동의 없이 상업적 및 기타 영리목적으로 사용할 수 없습니다

▫ 팬형의 코일이 위치할 때 하부루프코일의 영향을 확인

▫ 팬형의 코일의 최적화 된 권선 수는 Type 1의 결과를 활용하여 예측 할 수 있으므로 Type 2의 특징인 Sub 코일의 수에 따라 자장 균일도 변화를 예측하였음

- 하부코일의 수가 1개인 경우가 2개인 경우보다 자장의 균일도가 증가하는 결과를 보임
- 평균자장세기는 하부코일의 수가 증가함에 따라 같이 증가하는 경향을 보였으나 큰 차이는 없었으며 오히려 표준편차는 하부코일이 1개인 경우에 2개인 경우보다 더 작은 값을 가짐 (표 4.)
- 이는 하부코일을 이용하는 이점이 크게 작용하지 않는다는 것으로 결론지을 수 있으므로 Type 2의 형태는 배제

▫ 세포 시료가 위치할 부분의 자기장의 세기 측정 (평균, 표준편차)

<표 4. Type 2의 평균자장세기 및 표준편차>

권선 수	평균값(mT)	표준편차	비고
1	91.407	11.662	-
	94.011	0.9926	sub 1개
	95.248	10.031	sub 2개

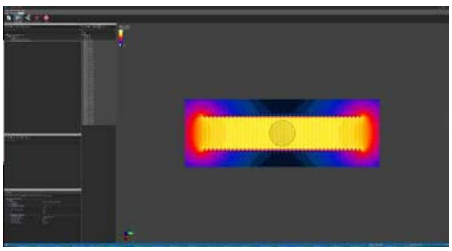
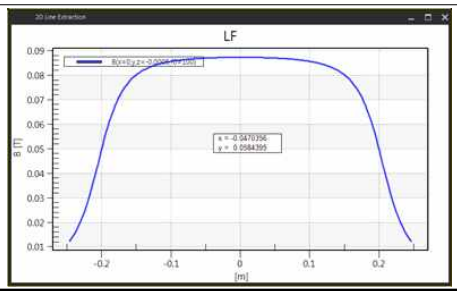
■ 솔레노이드 형태의 자기유도코일 프루브 ***(솔레노이드 형태, Type 3)***

▫ 내부 반지름 40㎜, 길이 400㎜ 형태로 설정 ($l = 10R$)

▫ Type 3은 다른 형태와 비교하였을 때 시편 내부 자장 균일도가 가장 높으나 코일의 사이즈가 다른 형태에 비해 큼

- 세포 시료를 정확하게 중앙에 위치시킬 수 있는 내부의 지지대 필요

<표 5. Type 3의 B-field 및 자장분포 그래프>

권선수	인가전류(A)	B-field (2D color map)	자계분포(중심선)	비고
41	1000			

▫ 세포 시료가 위치할 부분의 자기장의 세기 측정 (평균, 표준편차)

<표 6. Type 3의 평균자장세기 및 표준편차>

권선 수	평균값(mT)	표준편차	비고
41	87.25	0.0519	
	87.18	0.0303	

국가연구개발 보고서원문 성과물 전담기관인 한국과학기술정보연구원에서 가공·서비스 하는 연구보고서는 동의 없이 상업적 및 기타 영리목적으로 사용할 수 없습니다

② 코일을 이용한 효율적 전자기장 시스템 개발

■ 코일 제작용 지그 제작

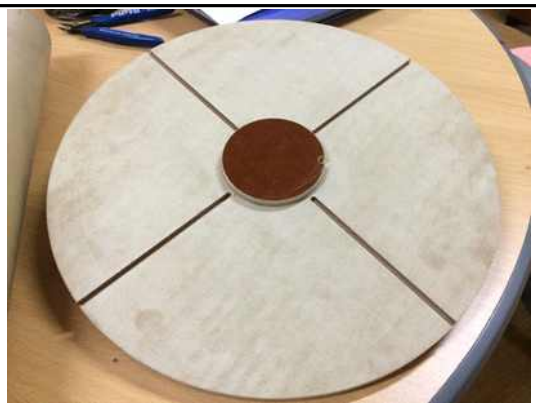
▫ 지그 용 재료 : 베크라이트 소재

▫ 팬 형태의 솔레노이드 코일 지그

- 내부 직경 : 70 mm
- 외부 직경 : 300 mm (권선 수에 따라 결정되나 지그임을 고려해 공차를 많이 두었음)
- 두께 : 6 mm (코일로 사용할 구리 선재의 두께와 동일)

▫ 솔레노이드 코일 지그

- 지름 : 80 mm
- 높이 : 400 mm



팬형의 솔레노이드 코일 지그

솔레노이드 코일 지그

<그림 8. 코일 제작 용 지그>

■ 코일제작

▫ 재료 : 에나멜 절연 코팅된 Rod 형 구리 선재

- 2 mm(두께) × 6 mm(높이)

▫ 팬형의 솔레노이드 자기유도코일 프로브 ***(디스크 형태, Type 1)***

- 원판모양의 코일 (내경 70 mm, 외경 180 mm)
- 권선 수 : 25회
- 인덕턴스 : 45 μH

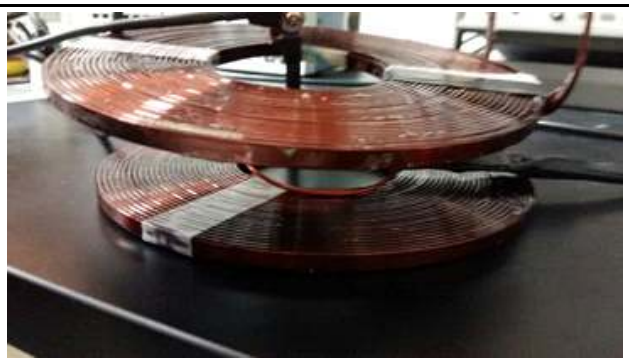
▫ 팬형의 솔레노이드 + 하부루프코일 형태의 자기유도코일 프로브 ***(디스크 + 하부코일 형태, Type 2)***

- 원판모양의 코일 (내경 70 mm, 외경 180 mm)
- 권선 수 : 25회
- 하부루프코일(Sub coil) : 권선 수 1회(one-loop coil)
- 인덕턴스 : 45 μH

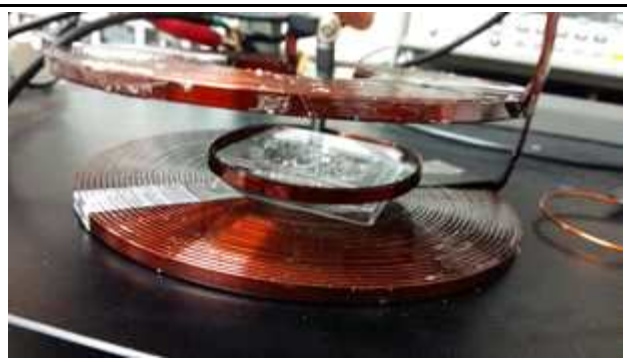
▫ 솔레노이드 형태의 자기유도코일 프루브 ***(솔레노이드 형태, Type 3)***

- 솔레노이드 형태이나 각 권선사이에 간격이 없는 형태
- 권선 수 : 67회
- 직경 : 80 mm, 높이 : 400 mm
  - 솔레노이드 내부에 4 well-plate가 삽입되어야 하므로 직경이 팬형의 코일보다 넓음
- 인덕턴스 : 65 μH

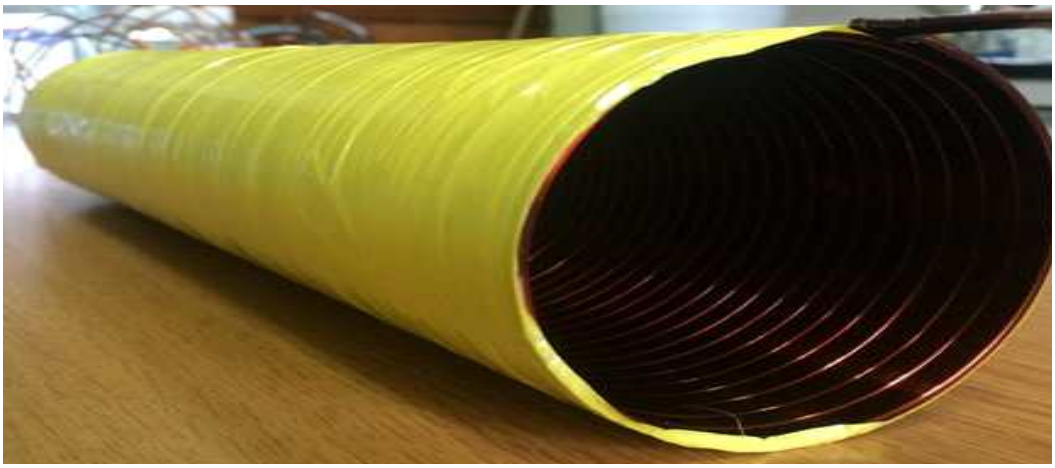
국가연구개발 보고서원문 성과물 전담기관인 한국과학기술정보연구원에서 가공·서비스 하는 연구보고서는 동의 없이 상업적 및 기타 영리목적으로 사용할 수 없습니다



< Type 1 >



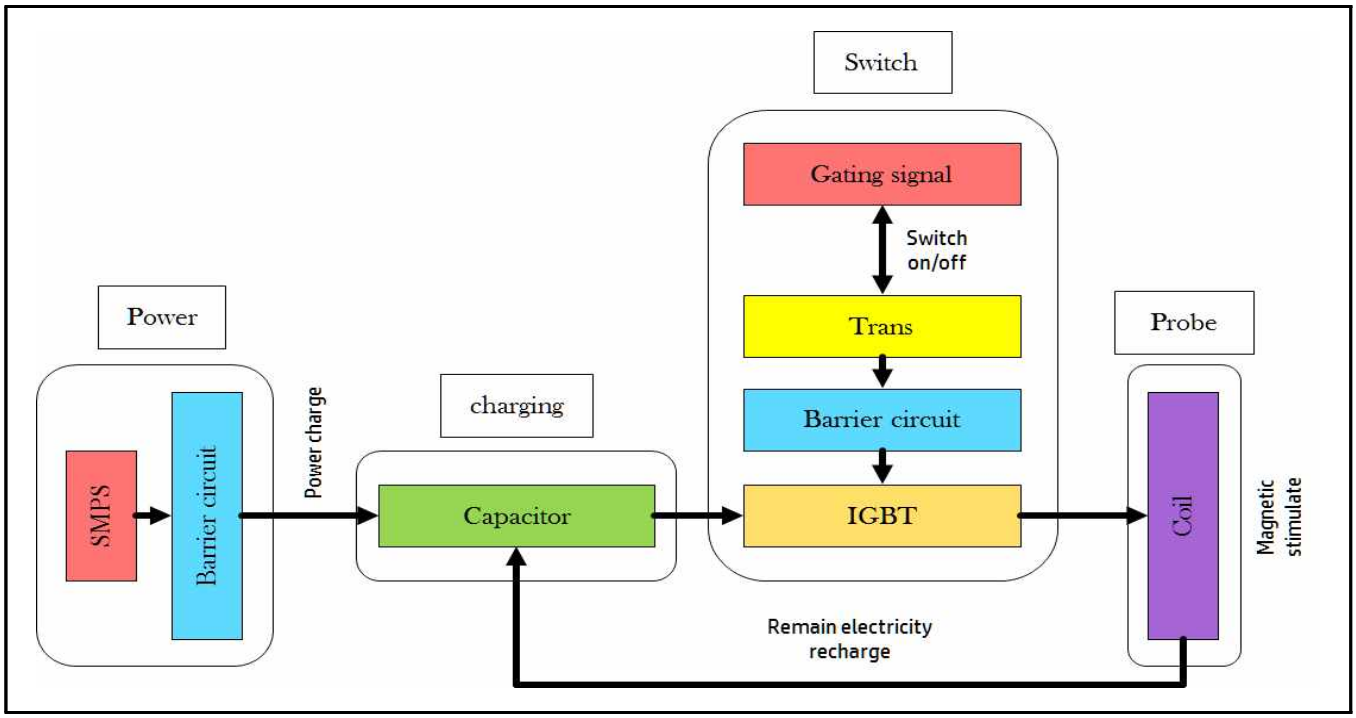
< Type 2 >



< Type 3 >

<그림 9. 제작된 코일>

■ 자기장발생 회로 제작

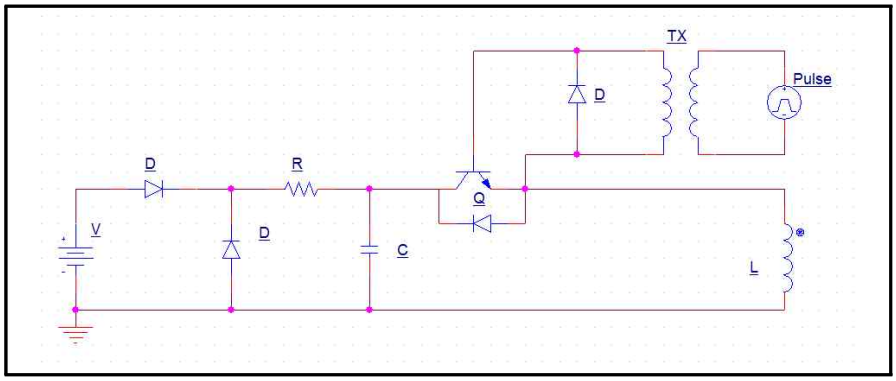


<그림 10. 시스템 블록다이어그램>

국가연구개발 보고서원문 성과물 전담기관인 한국과학기술정보연구원에서 가공·서비스 하는 연구보고서는 동의 없이 상업적 및 기타 영리목적으로 사용할 수 없습니다

▫ PEMF 방식을 이용한 시스템은 고에너지를 발생시켜 충·방전을 하는 충전부, 자기장을 유도하는 자기 유도 코일 프로브, 자기에너지의 스위칭을 제어하는 제어부 등으로 이루어짐 (그림 10.)

- 전원부 : 안정적으로 직류전원을 공급할 수 있는 장치와 충전부에 충전된 전력이 역으로 흐르지 않도록 막아주는 장치로 구성됨
- 충전부 : 캐패시터로 구성되는 충전부는 스위칭 제어부의 스위칭 신호 주기에 최대한 충·방전 효율을 가질 수 있는 형태로 구성
- 스위칭 제어부 : IGBT 소자의 On/OFF를 안정적으로 동작시켜 시스템의 안정성과 자기장 세기를 일정하게 유지할 수 있어야 함
- 자기장발생부(프로브) : 전원부와 충전부에서 발생한 에너지를 자기장으로 변환하는 부분



<그림 11. 자기장 발생 회로도>

<그림 12. 제작된 H/W 시스템>

국가연구개발 보고서원문 성과물 전담기관인 한국과학기술정보연구원에서 가공·서비스 하는 연구보고서는 동의 없이 상업적 및 기타 영리목적으로 사용할 수 없습니다

▫ 자기장 발생을 위한 회로도는 그림 11.과 같이 나타낼 수 있으며, 구성된 회로 및 소자는 그림 12에 나타내었음

- 전원부 : 직류전원장치(SMPS)와 다이오드로 구성
  - SMPS 정격출력 : 50 V, 1 A
  - 다이오드 : 전력 전기 회로용 소자 사용
- 충전부 : 권선 저항은 보호 저항으로 사용되며, 400V이상의 내압을 가지는 캐패시터를 이용하여 충전부 구성
  - 저항 : 100 W, 500 Ω
  - 캐패시터 : 400 V, 2.2 ㎌을 직·병렬로 연결
- 스위칭 제어부 : IGBT를 On/Off 시키기 위한 펄스를 인가하기 위한 부분으로, 자극 주기의 변화가 용이할 수 있도록 함수발생기를 이용하여 만든 파형을 펄스트랜스로 접지 분리하여 스위칭 제어함

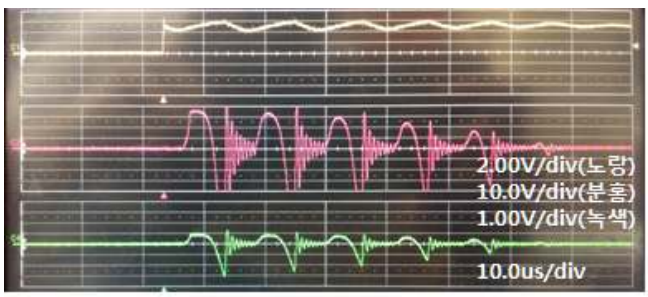
③ 개발된 펄스형 자기장 발생 시스템 평가

■ 자기장 발생 코일에 전류를 도통 시키기 위한 스위치 역할을 하는 IGBT 단자의 게이팅 전압에 따른 출력변화를 관찰

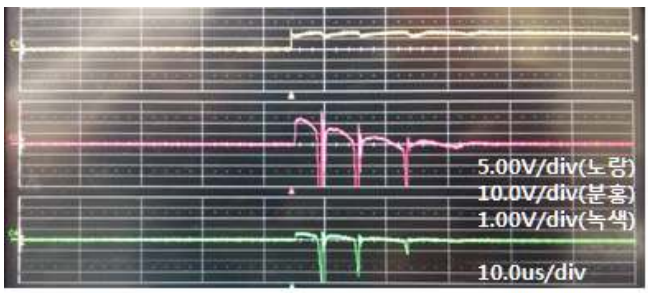
▫ 데이터시트 상 사용된 IGBT 단자의 게이트 전압은 5V이상만 인가되면 정상적으로 동작하는 것으로 나와 있으나 실제 측정을 통하여 10V 이상에서 안정적으로 동작하는 것으로 확인하였음

▫ 제어부에서 자기장발생 스위칭을 위한 **<u>게이트 단자의 인가전압은 10V로 설정</u>**하였음

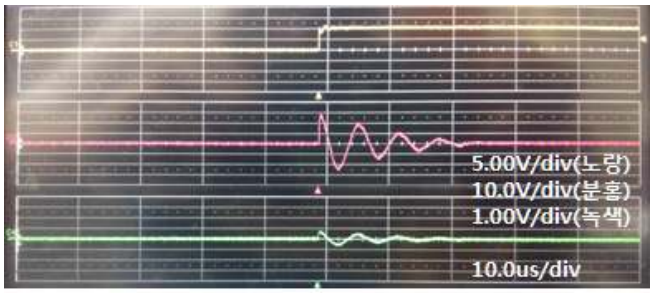
- 게이팅 펄스의 파형 (노란색), 코일 양단 전압 (분홍색), 측정용 유도 코일에 흐르는 전압(녹색)



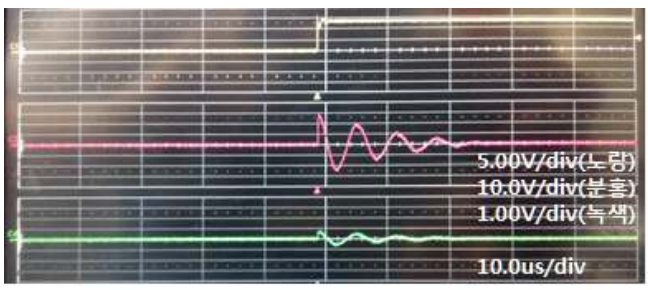
5V



7V



10V



15V

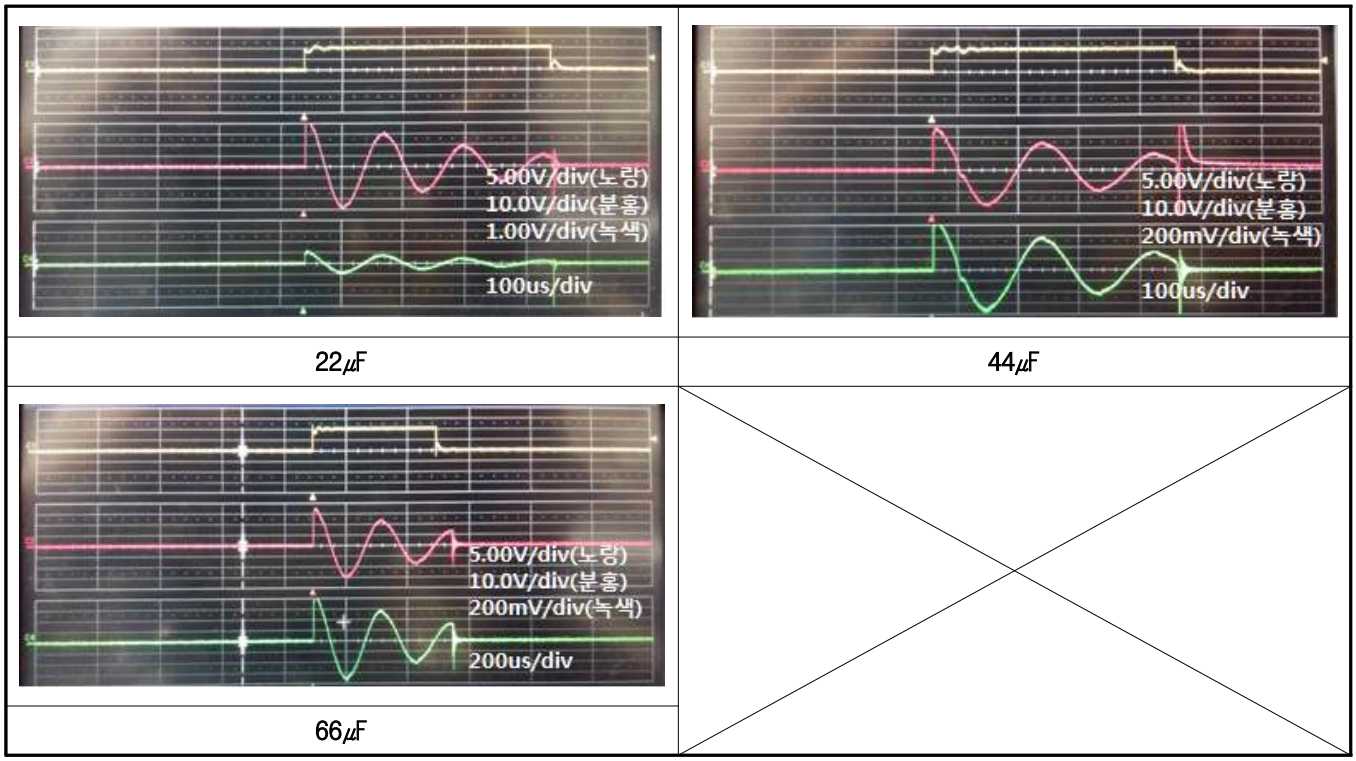
<그림 13. 스위칭 제어부 전압에 따른 결과 파형>

국가연구개발 보고서원문 성과물 전담기관인 한국과학기술정보연구원에서 가공·서비스 하는 연구보고서는 동의 없이 상업적 및 기타 영리목적으로 사용할 수 없습니다

■ IGBT 게이트 단자에 전압이 인가되고(스위치 on) 인덕턴스와 캐패시턴스의 값을 변화시켰을 때의 변화를 확인함

▫ 자기장 발생이 일어나는 시점 (스위치 on)의 시간동안 인덕턴스와 캐패시턴스 값이 자기장 펄스의 수를 결정

- 자장 발생 시간동안 한주기의 자극 파형이 인가될 때 가장 큰 자장이 발생함
- 인덕턴스와 캐패시터 값의 변화에 따라 발생하는 자기장 펄스 주기의 변화를 확인하기 위하여 주파수와 듀티는 일정하게 하고 캐패시턴스에 의한 변화를 관찰하였음
- 25㎐, 듀티 1% 일 때 캐패시턴스에 의한 변화를 관찰 (그림 14.)



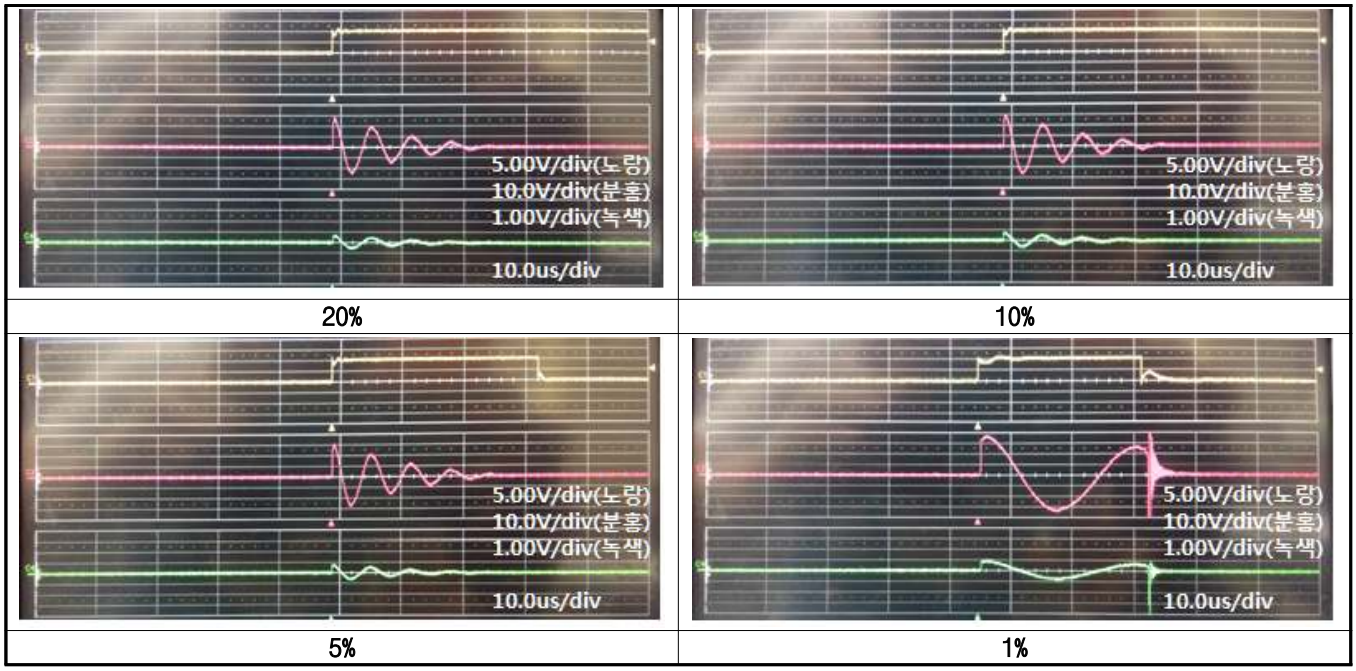
<그림 14. 캐패시터 용량 변화에 따른 자기장 펄스의 변화 (25㎐, 듀티 1%)>

■ 캐패시터로 이루어진 충전부에서 충분히 충전이 된 후에 방전이 일어나야 함. 이를 위해 스위칭 주파수 및 듀티의 최적화가 필요함

▫ 동일 주파수에서 듀티 변화에 따른 코일에 인가되는 전압의 첨두치를 확인함

- 듀티비에 따라 충전시간의 차이에 의한 첨두치가 달라지는 현상을 확인
- 듀티 20%, 10%, 5%의 경우 스위칭 On 시간이 길어 자기장 발생이 종료된 후에도 스위칭 On 상태를 유지하고 있음
- 이는 불필요하게 On 시간을 조절하면 충전부의 캐패시터의 충전 시간을 길어지게 하는 효과를 줄 수 있음
- 즉, 충전부에서 충전을 충분히 한 상태에서의 자기장 발생이 일어나게 되어 동일한 시스템에서 더 큰 자장을 인가할 수 있음
- **1%이하의 듀티를 가질 때 코일에 최대의 전압이 인가**됨을 확인
- 자장을 발생시키는 스위칭 제어부의 주파수를 변화시킬 때 최적의 듀티를 찾아야 함

국가연구개발 보고서원문 성과물 전담기관인 한국과학기술정보연구원에서 가공·서비스 하는 연구보고서는 동의 없이 상업적 및 기타 영리목적으로 사용할 수 없습니다



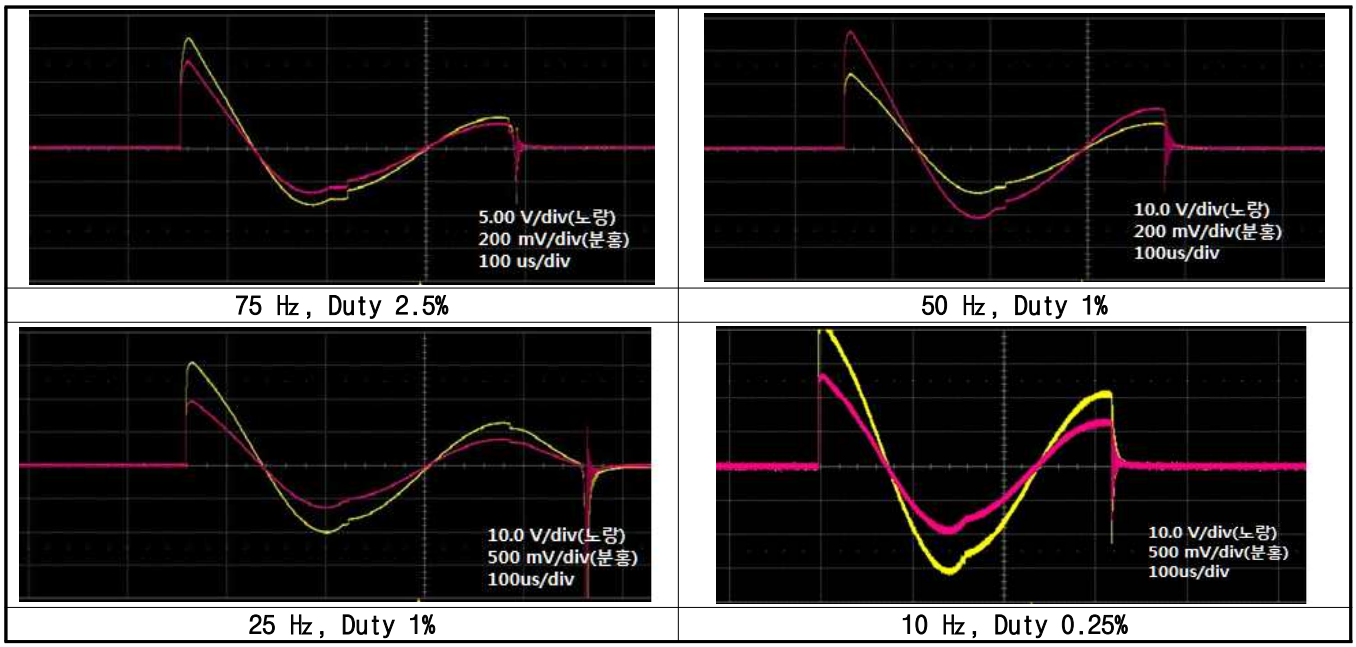
<그림 15. 듀티 변화에 따른 자기장 펄스의 변화>

■ 자극 파형이 동일하게 발생되는 주파수와 듀티를 설정하여 코일에 인가되는 전압의 첨두치를 확인함

▫ 앞선 실험의 결과로 스위칭 제어부의 On시간동안 한 주기의 자기장 발생이 일어나는 경우에 자기장 펄스의 첨두치가 가장 높은 값을 나타내는 것을 확인하였음

▫ 동일하게 한주기의 자기장 발생 파형을 형성하는 조건 하에서 스위칭 제어부의 주파수를 변화시켰을 때의 자기장 발생부의 첨두치 변화를 확인하였음 (그림 16.)

- 스위칭 제어부의 주파수는 문헌조사를 통해 확인한 75 Hz, 50 Hz, 25 Hz, 10 Hz를 사용하였고 각 주파수 별로 한 주기의 파형이 인가되는 듀티를 설정하였음
- **10 Hz 0.25%의 듀티를 가질 때 코일에 최대의 전압이 인가**됨을 확인



<그림 16. 한 주기 자장펄스를 발생하는 스위칭 주파수, 듀티를 이용한 자기장 펄스의 변화>

국가연구개발 보고서원문 성과물 전담기관인 한국과학기술정보연구원에서 가공·서비스 하는 연구보고서는 동의 없이 상업적 및 기타 영리목적으로 사용할 수 없습니다

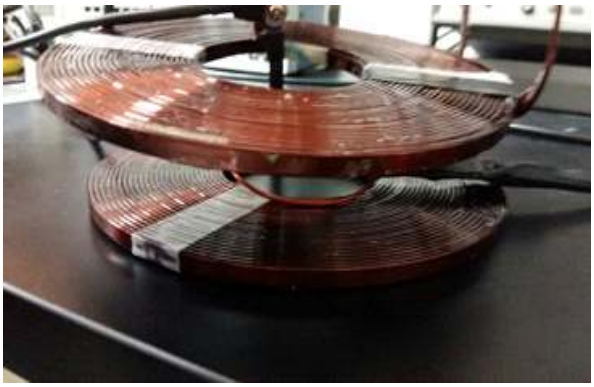
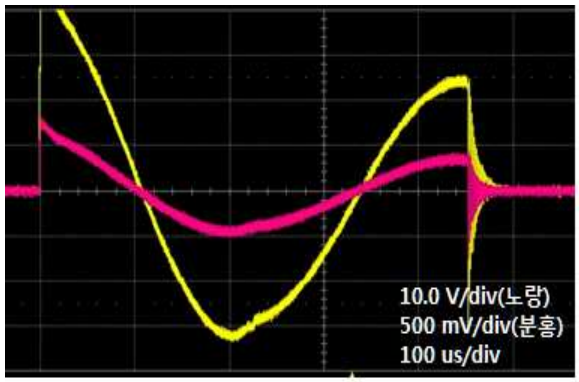
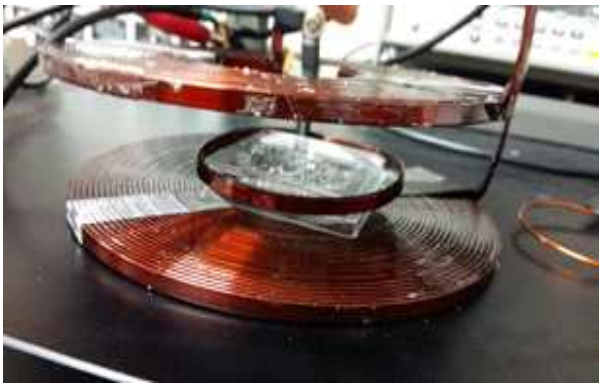
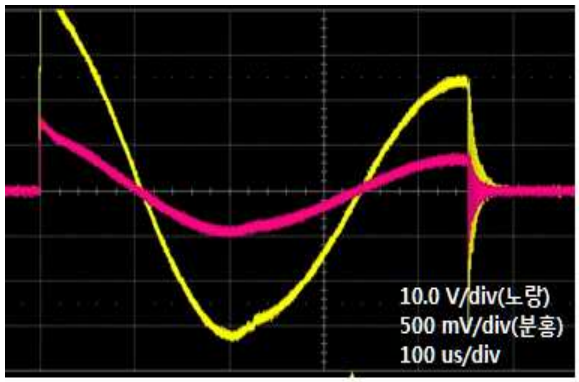
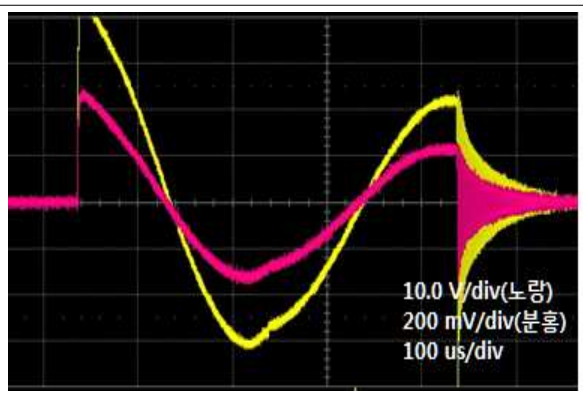
■ 실험 결과로 도출 된 **10 Hz, 듀티 0.25%의 파형을 제작된 코일 (Type 1, 2, 3)에 인가하였을 때의 결과 파형**을 확인함 (표 7.)

▫ 제작된 코일의 양단에서 측정되는 파형의 첨두치는 Type 1, 2, 3 모두 유사한 결과를 가짐(노란색 그래프)

▫ Type2는 서브코일이 추가되었지만 Type1과 출력에서 차이가 거의 없음을 확인

▫ 시료가 위치하는 곳(코일의 중심부분)에서 픽업코일을 통해 측정된 결과에서 Type 3의 값이 가장 낮은 값이 측정되었음(분홍색 그래프)

<표 7. 10 Hz, 듀티 0.25%를 인가하였을 때 측정된 자기장 펄스파형>

종류	제작된 코일형태	결과
Type 1		
Type 2		
Type 3		

■ 시물레이션의 결과와 실제 제작되어 측정된 결과에서 가장 좋은 특성을 보이는 **Type 1을 이용하여 세포실험 진행**함

국가연구개발 보고서원문 성과물 전담기관인 한국과학기술정보연구원에서 가공·서비스 하는 연구보고서는 동의 없이 상업적 및 기타 영리목적으로 사용할 수 없습니다

3) 결론 및 고찰

■ 컴퓨터 모의실험을 이용하여 균일한 자기장이 발생하는 디자인을 제시

▫ 코일 제작에 필요한 변수인 권선 수, 내부직경, 외부직경을 변경하여 최종 코일의 형태를 도출

- Disk-pair coil: 25회 권선 수 일 때 약 60 μH의 인덕턴스를 가지는 코일을 제시함
- 개발된 Disk-pair coil의 출력은 자기장 발생 시 시료 내에서 오차범위 ± 5% 이내로 제작함

(2) PEMF 장치의 세포자극 프로토콜

■ PEMF 자극기 문헌조사를 통해 자극 효과를 가장 효율적으로 확인할 수 있는 세포를 선택하여 자극기 성능 평가 시행

1) 연구 방법

■ 세포자극 프로토콜 문헌조사

▫ Bone Regeneration(골 재생)

- Int. J. Immunopathol. Pharmacol. 2011, 24(1), 1-6
  - 자극 조건: 75 Hz, 2 mT, 20분/일
  - 효과: 3차원 배양된 줄기세포의 골분화 시 분화/증식이 활발해지고, bone ECM이 향상되는 것을 확인
- Biochem Biophys Res Commun 1998, 250, 458-461
  - 자극 조건: 15 Hz(sawtooth waveform of 4.5ms burst), 0.6 mT, 15일
  - 효과: NO(Nitric oxide) 합성의 증가로 인해 골아세포의 증식이 활발
- J Dent Res. 1992, 71(12), 1920-1925
  - 자극 조건: 15/75 Hz(repeating 0.3ms), 2 mV/cm, 2시간
  - 효과: PKA, PKC pathway에 의해 골아세포의 활성이 증가

▫ Articular Regeneration (관절 재생)

- Connect Tissue Res, 2001, 42(4), 269-279
  - 자극 조건: 75 Hz, 2.3 mT, 1, 6, 9, 18시간, 3, 6일
  - 효과: cAMP metabolism의 변화로 인해 콜라겐 생성
- Ann Rheum Dis 2002, 61, 1032-1033
  - 자극 조건: <30 Hz, 10~20G, 3시간/일, 3일
  - 효과: OA chondrocyte에서의 세포 배지 내 proteoglycan의 농도의 증가를 확인함

■ 문헌조사를 활용한 세포자극 프로토콜 확립

▫ 문헌조사의 결과 주파수 100 Hz 이하, 자장 강도 수 G ~ 10 mT를 이용하여 세포 자극을 실시하였음

▫ 세포 자극 시간 및 주기의 경우 변수의 범위가 넓어(0.3 ms ~ 72 h) 단정할 수는 없으나 1 시간 전후의 자극이 가장 많이 사용되었음

▫ 문헌 조사의 결과로 도출한 세포 자극 프로토콜

- 주파수 : 100 Hz 이하
  - 캐패시터 충·방전 시간을 고려하여 강한 자장이 나올 수 있도록 10 Hz, 25 Hz, 50 Hz, 75 Hz의 주파수를 이용하여 시스템 특성을 확인
- 자장강도 : 10 mT 이하 (필드 자장 측정에 어려움이 있어 유도픽업코일의 전압 첨두치로 확인)
- 자극시간 : 1시간

국가연구개발 보고서원문 성과물 전담기관인 한국과학기술정보연구원에서 가공·서비스 하는 연구보고서는 동의 없이 상업적 및 기타 영리목적으로 사용할 수 없습니다

- 실험기간 : 7일

2) 연구 결과

■ 제작한 전자기장 발생 장치의 성능 평가: 세포 자극 효과 확인

■ 세포 시료 제작 방법

▫ 세포: 연골세포

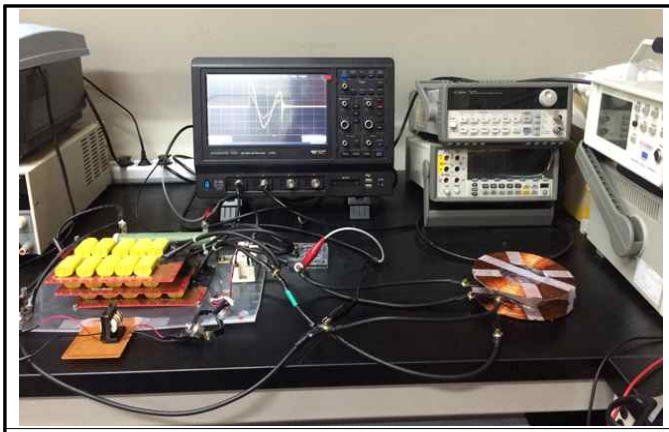
- 세포 파종 농도: 1x10^{4}cell/well, 4 well-plate에 파종
- 세포 배양 방법: DMEM-HG (1% FBS, 1% antibiotic)을 이용하여 3일에 한 번씩 배지 교환
- 샘플: 대조군-전자기장 자극 무 (n=4), 실험군-전자기장 자극 유무 (n=4)

■ 연골세포 자극을 위한 자극 프로토콜 및 실험 사진

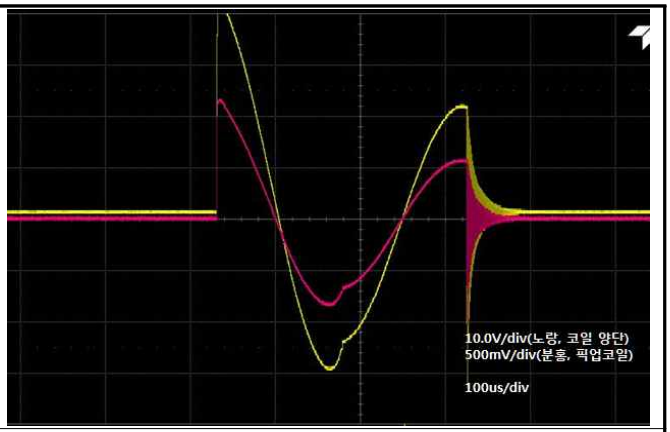
▫ 자극 프로토콜 : 10㎐, 듀티 0.25%, 자극세기 : 70V$_{p-p}$

▫ 목표: 연골세포 대조군과 전자기장 자극한 세포 실험군 사이의 세포 증식의 유의한 차이 확인

- 세포 파종 후 24시간 안정된 후부터 자극 시작
- 자극 조건: 1시간/일, 매일, 7일간



<세포자극 실험 사진>



<세포자극 파형>

<자기장 발생 부 내 세포 시편의 위치>

<자기장 발생 부 내 세포 시편 및 자장 측정용 픽업코일 위치>

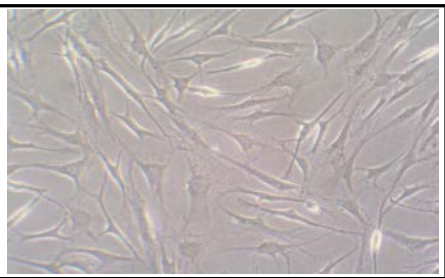
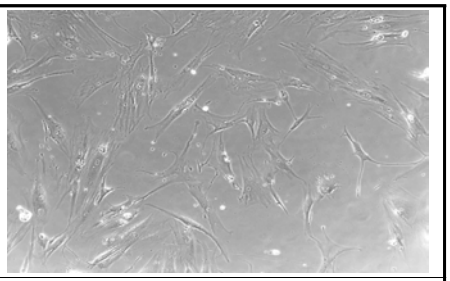
<그림 17. 연골 세포를 이용한 자기장 자극 실험>

■ 전자기장 발생 장치를 이용한 세포 자극 효과 확인

▫ 세포 형태 확인

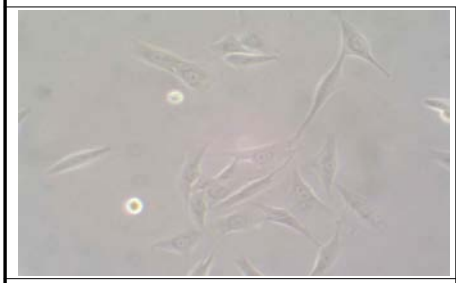
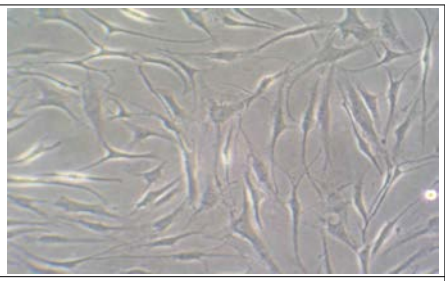
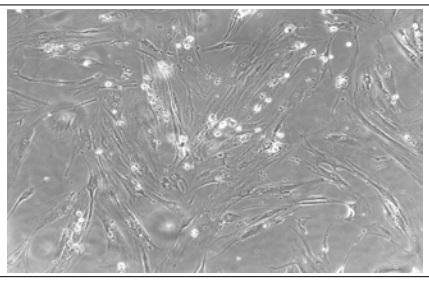
국가연구개발 보고서원문 성과물 전담기관인 한국과학기술정보연구원에서 가공·서비스 하는 연구보고서는 동의 없이 상업적 및 기타 영리목적으로 사용할 수 없습니다

- 광학 현미경을 이용하여 대조군과 실험군 사이의 형태 및 세포 밀도 확인
- 측정: 1, 3, 7일차 세포 측정
- 결과
  - 대조군과 실험군의 세포를 일자별로 비교하여 관찰함 (그림 18)
  - 현미경 사진 상으로 관찰시 1, 3일차에서는 차이를 보이지 않았으나 7일차에서는 대조군보다 실험군에서 더 많이 증식한 것을 확인할 수 있음
  - 이 결과를 바탕으로 정량적인 결과를 도출하기 위해 MTT assay를 수행함

(a) 1일차 (b) 3일차 (c) 7일차

< 연골세포: 대조군 >

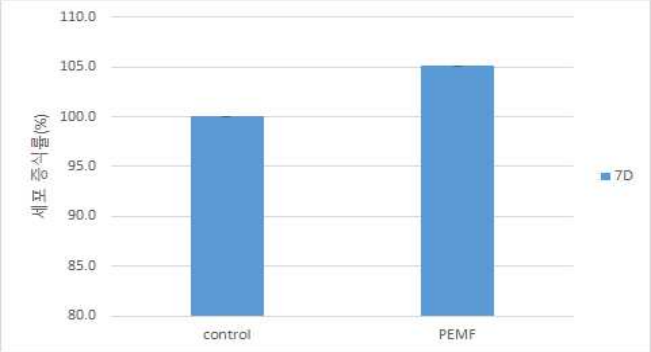
(a) 1일차 (b) 3일차 (c) 7일차

< 전자기장 자극을 가한 연골세포: 실험군 >

< 그림 18. 전자기장 자극을 가한 연골세포의 현미경 사진 >

□ 세포 증식률 확인: MTT assay
- Cell Proliferation Kit Ⅰ, MTT(Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) 사용
- 595nm의 파장의 ELISA reader(Thermo Scientific Inc., USA)를 이용하여 흡광도 측정
- 실험군의 흡광도 측정값을 대조군의 흡광도 측정값에 대한 백분율 값으로 나타내어 세포 증식률을 계산
- 측정: 7일차 대조군과 실험군 사이의 증식률 측정
- 결과
  - 대조군의 측정값을 100%로 정규화 하여 실험군과 비교 분석 (그림 19)
  - 대조군의 경우 100 ± 0.013%비교한 결과 PEMF 자극한 실험군의 경우 105.1 ± 0.019%로 자극 후 5%의 성장률을 보임.
  - 이 결과를 통하여 제작한 전자기장 발생 장치의 세포 증식에 관한 효과를 확인함

국가연구개발 보고서원문 성과물 전담기관인 한국과학기술정보연구원에서 가공·서비스 하는 연구보고서는 동의 없이 상업적 및 기타 영리목적으로 사용할 수 없습니다



<그림 19. PEMF 자극 유무에 따른 세포 증식률>

3) 결론 및 고찰

- 문헌조사를 통한 PEMF 자극 조건에 따른 연골 세포 증식 확인
  - 개발한 PEMF 자극기로 자극한 연골세포의 증식을 확인함으로써 자극기의 자극이 유효함을 확인
- 세포 자극 코일이 좀 더 높은 출력과 균일한 자장 분포를 가질 수 있게 정교한 제작이 필요함
- 제작한 코일의 자기장 출력이 시뮬레이션과 같이 균일한 분포를 나타내는지 확인이 요구됨
- 위의 실험을 바탕으로 다양한 조건들(자극 주파수, 듀티, 자장 세기, 자극 시간)을 실험에 적용하여 연골에서 가장 적합한 자극 프로토콜을 개발의 가능성을 제시함
- 차후 연골뿐만 아니라 다양한 세포에 적용할 수 있을 것으로 사료됨

국가연구개발 보고서원문 성과물 전담기관인 한국과학기술정보연구원에서 가공·서비스 하는 연구보고서는 동의 없이 상업적 및 기타 영리목적으로 사용할 수 없습니다

나. 2차년도

2차년도 목표	**제작한 펄스형 전자기장 시스템을 조직 유사 물질 팬텀 및 지방 분화 세포에 적용하여 자극 프로토콜 확립과 함께 자극의 유효성 검증**

■ 조직 유사 물질 팬텀 및 지방 분화 세포를 이용한 펄스형 자기장 자극 프로토콜 확립

■ 조직 유사 물질 팬텀을 이용한 자장 자극 시스템 평가
■ 지방세포 및 공배양세포(조직)를 이용한 지방분해 자장 자극 파라미터 확립
■ 줄기세포의 지방 분화 시 지방 분화 억제 효과 평가

※ 1차년도에 개발 된 펄스형 자기자극 (PEMF) 장치의 성능을 평가하기 위하여 조직 유사 물질 팬텀의 변화를 관찰함
※ 세포시료에 효과적인 자기자극 파라미터를 확립하여 그 변화를 관찰하여 개발된 펄스형 자기자극 시스템의 신뢰성을 확보하는 것에 있음

■ 펄스형 자기자극 (PEMF) 장치의 성능을 평가
  ▫ ~1.0T의 강한 자기장에서 세포 변화를 관찰하기 위하여 자기자극 시스템 성능 개선
  ▫ 팬텀을 이용한 PEMF 자극 관찰
    - 지방 조직 또는 복부 지방 유사 팬텀 제작: 조직 유사 BSA 팬텀
      ✓ 제작한 팬텀에 PEMF 자극을 가하여 물질 변성 관찰
■ 펄스형 자기자극 (PEMF) 장치의 세포자극 신뢰성 확보 및 검증
  ▫ 연골세포에서의 변화 관찰: 세포 증식
    - 타겟세포: 연골세포
      ✓ 자극 주파수와 자장세기를 조절하여 세포 증식에 미치는 영향 확인
      ✓ PEMF 자극군의 세포 증식이 대조군에 비해 활발한 것을 확인
  ▫ 지방세포 및 지방 분화 줄기세포와 지방 조직(공배양세포)과 줄기세포 분화 시 변화 관찰: 지방분화 억제
    - 지방세포와 지방분화 줄기세포를 배양하여 전자기장이 세포 분화에 미치는 영향 확인
      ✓ 타겟세포: 3T3-L1(지방세포), rMSC(골수유래줄기세포)
    - 지방조직(공배양세포)를 배양하여 전자기장이 세포 분화에 미치는 영향 확인
      ✓ 타겟세포: 3T3-L1(지방세포)와 rMSC(골수유래줄기세포)를 이용한 공배양법 적용

---

(1) 펄스형 자기자극 장치 성능개선

■ PEMF 자기자극기의 코일과 구동부를 최적화 하여 더욱 효과적인 자기자극이 이루어지도록 함

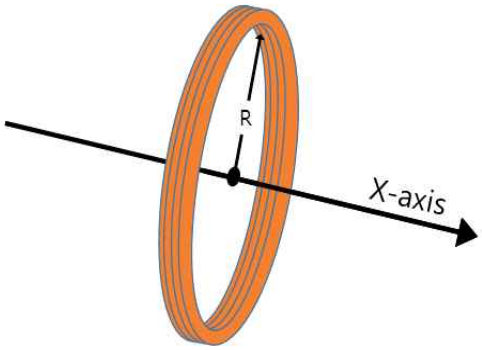
1) 연구 방법

① 코일 디자인

▪ 자기장 세기를 증가시키기 위해서는 단일 코일로 구성하는 것에는 한계를 가지므로 권선 수를 증가시

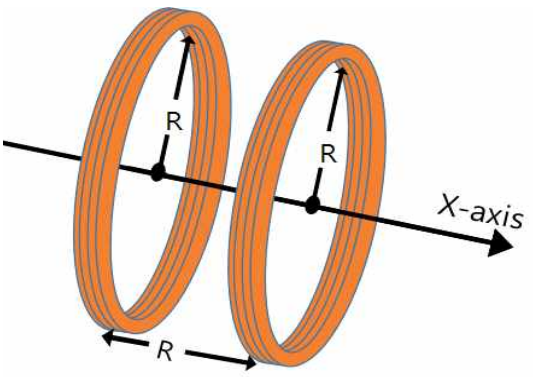
켜 인덕턴스를 크게 만들어 자장을 강하게 하는 방법을 고려해야함

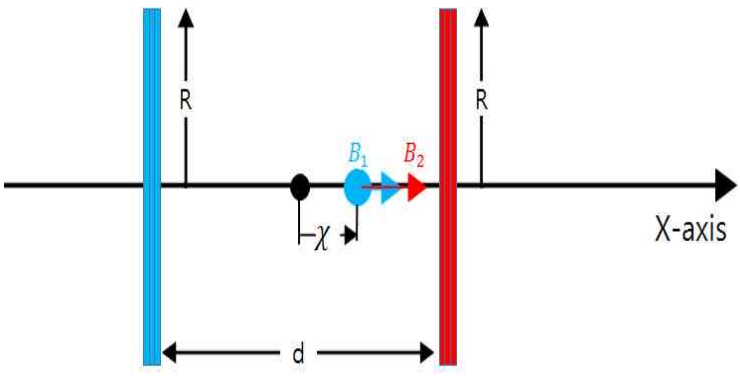
- 평판 나선형 코일은 동일 구조에서 권선 수를 증가시켜 인덕턴스를 크게 할 수 있는 방법이므로 자기장 발생 코일의 디자인으로 적합한 형태임
- 최종으로 시료가 위치할 4well-plate에 균일한 자장이 형성될 수 있는 디자인으로 helmholtz 코일형태를 기반으로 하는 쌍으로 된 평판 나선형 코일을 쌍으로 구성하여 균일한 자장을 형성하게 함
  - 헬름홀츠 형태는 중앙면에서 필드가 균일하게 형성되나 4well-plate 내부에 균일한 자장을 형성하기 위해서는 쌍으로 된 코일 간의 간격이 증가해야함
  - 코일의 크기를 고정하였을 때 자장의 세기를 증가 시킬 수 있는 팬형 솔레노이트 형태를 고려하여 디자인함
- 다음의 코일 관련 이론을 바탕으로 코일을 디자인함
  - 단일 코일 형태
    - 반지름이 R이고 선을 N번 감은 원형 코일이 있다고 가정할 때, 코일의 중심을 수직으로 지나는 축에 대한 자기장은 다음과 같이 정의됨



$$B = \frac{\mu_o N I R^2}{2\left(x^2 + R^2\right)^{\frac{3}{2}}}$$

  - 헬름홀츠 코일 형태
    - 두 개의 코일이 아래의 그림과 같이 있을 때, 전체 자기장은 각각의 코일의 자기장의 합임





$$\overrightarrow{B} = \overrightarrow{B_1} + \overrightarrow{B_2} = \frac{\mu_o N I R^2}{\left(\left[\frac{d}{2} - x\right]^2 + R^2\right)^{\frac{3}{2}}}\hat{x} + \frac{\mu_o N I R^2}{\left(\left[\frac{d}{2} + x\right]^2 + R^2\right)^{\frac{3}{2}}}\hat{x}$$

    - Helmholtz 코일에서 두 개의 분리된 코일 간의 거리 d는 코일의 반지름 r과 같다. 두 개의 코일 사

국가연구개발 보고서원문 성과물 전담기관인 한국과학기술정보연구원에서 가공·서비스 하는 연구보고서는 동의 없이 상업적 및 기타 영리목적으로 사용할 수 없습니다

이에 거리를 두었을 때, 코일들 사이에서 균일한 자기장이 형성됨

- 두 개의 코일 간의 거리 d가 0일 때, X-축 상에서 두 개의 코일 사이의 중심에 있는 점의 자기장은 아래의 식과 같음

$$\overrightarrow{B} = \frac{8\mu_o NI}{\sqrt{125}R}\hat{x}$$

R = radius of the coils

N = turns of the coils

I = current

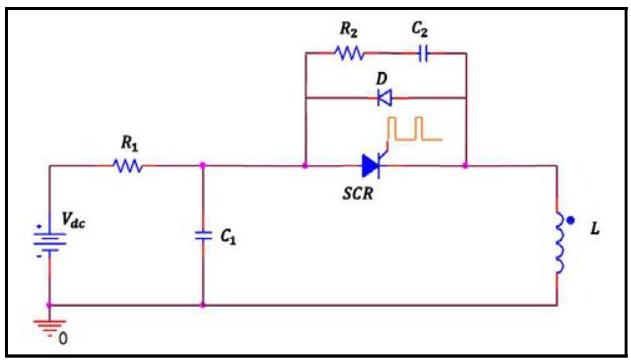
μ_0= magnetic flux density

B = magnetic field at the mid-plane

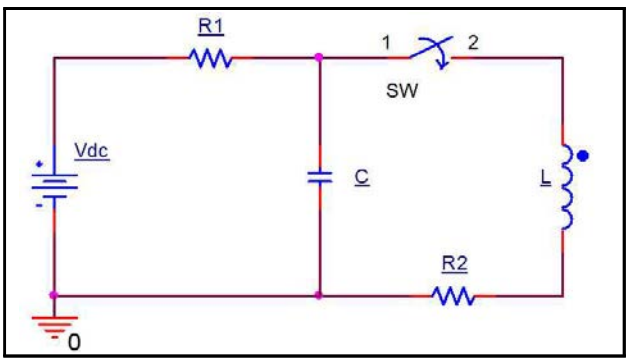
- 디자인된 코일을 Sim4Life software v2.2 (ZMT, Zurich, Switzerland)를 이용하여 모의실험 함
  - 유한차분 시간영역법(FDTD : Finite Difference Time Domain) 방법을 이용
  - 전자기파가 공간이나 매질 내에서 전파되는 것을 확인하기 위하여 맥스웰 방정식을 이용
  - 전자기장 발생장치 제작을 위해서는 저주파에서의 전자기장 해석이 필요하며 이를 위해 맥스웰의 컬 방정식으로 해석하는 Low Frequency Solver를 이용
  - Low Frequency Solver type은 Biot-Savart 법칙을 적용하는 Magneto quasi-static을 사용

② 펄스형 전자기장 발생 시스템 (PEMF)

- 인체와 같이 자기장이 잘 투과되는 도전체에 펄스형의 자기장을 투과시키면 Eddy Current가 발생하고, 이와 같이 생체조직에 유도된 생체 전류는 전기 생리학적인 기전에 의해 인체 각 조직에 효과적인 자극을 줄 수 있음



< 그림 20. 대전류 회로도 >



< 그림 21. 회로 설계를 위한 등가회로 >

- 여기서의 저항(R2)은 회로의 내부 저항을 고려한 것임
- 코일에 걸리는 전압을 Laplace Transform을 이용하여 근사화하면 아래의 식으로 표현할 수 있음

국가연구개발 보고서원문 성과물 전담기관인 한국과학기술정보연구원에서 가공·서비스 하는 연구보고서는 동의 없이 상업적 및 기타 영리목적으로 사용할 수 없습니다

$$V_L = \left(\frac{sL}{R+sL+\frac{1}{sC}}\right)\frac{V_p}{s} = \left(\frac{s}{s^2+\frac{R}{L}s+\frac{1}{LC}}\right)V_p = \left(\frac{s\times V_p}{\left(s+\frac{R}{L}\right)^2+\frac{1}{LC}-\left(\frac{R}{2L}\right)^2}\right)$$

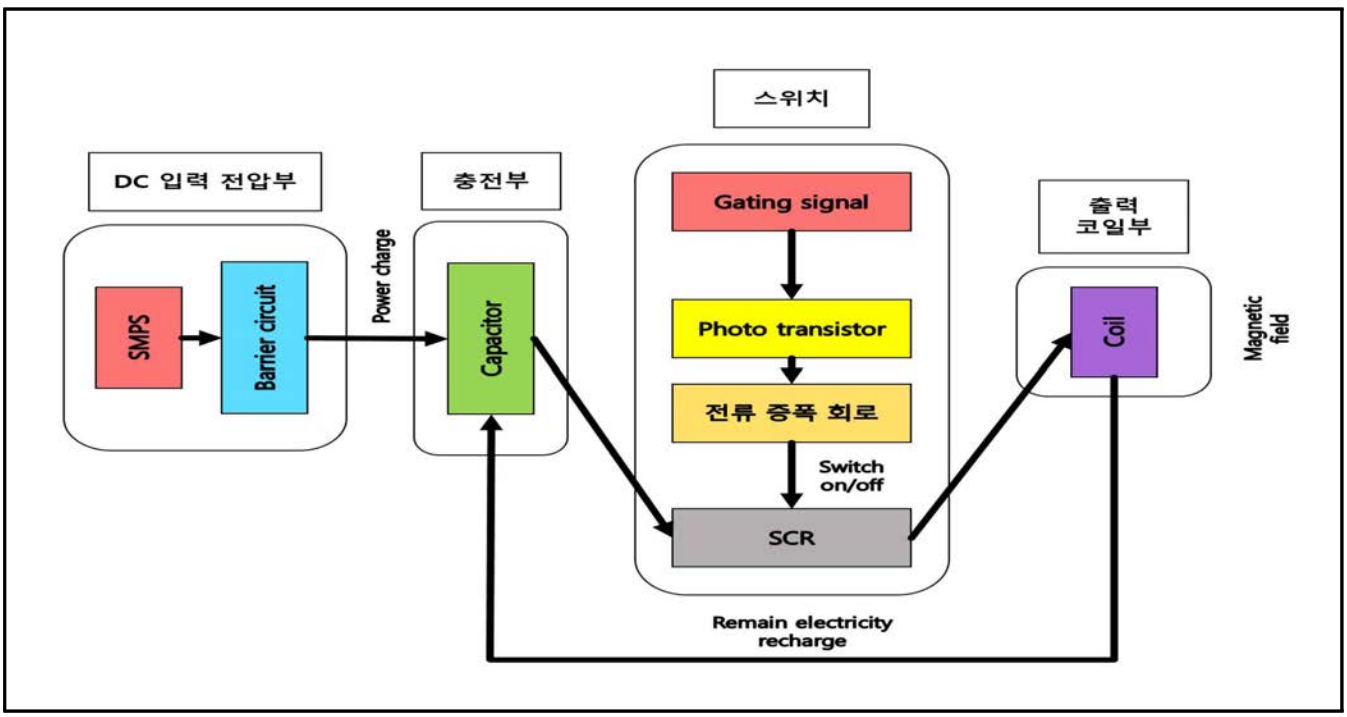
$$= \left(\frac{s\times V_p}{\left(s+\frac{R}{2L}\right)^2+\omega^2}\right) = V_p\left(\frac{s+\frac{R}{2L}}{\left(s+\frac{R}{2L}\right)^2+\omega^2} - \frac{1}{\omega}\frac{\omega\times\frac{R}{2L}}{\left(s+\frac{R}{2L}\right)^2+\omega^2}\right)$$

$$= V_p\times e^{-\frac{R}{2L}t}\left(\cos(\omega t) - \frac{R}{2\omega L}sin(\omega t)\right)$$

$$= \sqrt{1+\left(-\frac{R}{2\omega L}\right)^2}\,V_p e^{-\frac{R}{2L}t}\cos\left(\omega t \pm \tan^{-1}\left(\frac{R}{2\omega L}\right)\right)$$

★ $Acos(x)+Bsin(x) = \sqrt{A^2+B^2}cos(x\pm\delta), \tan(\delta) = \mp\frac{B}{A}, A=1, B=-\frac{R}{2wL}$

- 자기장 발생용 구동 모듈 제작
  - 위의 그림에서 V_{dc}는 회로에 큰 전압을 인가하여 자기장을 발생시키는 주 에너지원으로 사용됨
  - 커패시터(C_1)는 V_{dc}로부터 출력되어 나오는 전압(에너지)을 충·방전하는 역할을 함
  - 저항 R_1는 캐패시터 충전 전류를 결정하는 역할을 함
  - 프로브 코일(L)은 인가된 에너지로부터 만들어진 전류를 통해 자기장을 발생시키는 역할을 함
  - SCR (silicon-controlled rectifier)는 전기적 스위치로써 SCR 트리거 모듈로부터 출력된 파형에 따라 단선, 결선(스위치 on/off)의 역할을 함
  - SCR의 on/off에 따라 커패시터에 충전된 전압이 프로브 코일에서 자기장을 발생시킴
  - 또한 각 소자의 R, L, C 값들은 프로브 코일로부터 출력되는 자기장 파형에 영향을 미침



< 그림 22. 구동 모듈 Flow Chart >

국가연구개발 보고서원문 성과물 전담기관인 한국과학기술정보연구원에서 가공·서비스 하는 연구보고서는 동의 없이 상업적 및 기타 영리목적으로 사용할 수 없습니다

▪ PEMF 제어 보드 개발

▫ PEMF 구동을 위해서는 SCR과 트리거 모듈의 Gating Pulse 출력을 이용하여 고전압단의 출력을 순간적으로 충·방전시켜야 하므로 이를 제어하기 위하여 Gating Pulse를 출력할 수 있으며, 출력되는 주파수 및 듀티를 on/off 시간(㎲)으로 조절하여 자기장의 자극 주기를 조절 할 수 있도록 개발함

③ 팬텀 제작

▪ 목적: 지방유사조직 팬텀인 BSA 팬텀과 TMM과 글리세롤 팬텀을 혼합한 팬텀을 제작하여 외부 자기자극에 대한 앞의 두 지방유사 조직의 변성을 눈으로 확인하고자 함.

▪ TMM phantom

▫ TMM 합성 재료

: Agar, 염화 벤잘코늄(Benzalkonium chloride), 글리세롤, Distilled water, 실리콘 카바이드[SiC(-400 mesh)], 산화알루미늄[Al_2O_3 (0.3um)], 산화알루미늄[Al_2O_3 (3um)]

▫ TMM의 합성

㉠ 빈 종이컵에 100ml 기준으로 Agar 3.64g과 실리콘 카바이드 0.639g, 0.3um 산화알루미늄 1.06g, 3um 산화알루미늄 1.133g 혼합

㉡ 비커에 증류수 100ml를 첨가한 뒤 50℃까지 가열

㉢ 증류수의 온도가 45~50℃가 되면 측량된 고체 시약과 염화 벤잘코늄 0.567ml, 글리세롤 13.51ml를 첨가하여 마그네틱 바를 이용하여 혼합

㉣ 혼합물을 90℃까지 가열되면, 가열을 중단하고 50℃까지 식히면서 마그네틱 바로 지속적 교반

㉤ 혼합물이 50℃가 되면 준비된 팬텀 주형에 기포가 생기지 않게 천천히 주입

㉥ 팬텀은 상온에서 완전히 굳힌 후 실험에 사용

▪ BSA phantom

▫ 지방 유사 팬텀 합성 재료

: 40% Acrylamid Solution, Distilled water, 1M TRIS, 10% APS, TEMED, BSA(Bovine serum albumin), Corn syrup

▫ 지방 유사 팬텀의 합성

㉠ 비커에 100ml 기준으로 40% Acrylamid Solution 17.5ml과 1M TRIS 10ml, Distilled water 71.61ml, BSA 7g를 중량비 만큼 첨가한 뒤 Corn syrup 10ml를 넣어 마그네틱바를 이용하여 혼합

㉡ 어느 정도 혼합한 후, 10% APS 0.504ml과 TEMED 0.03ml를 추가하여 혼합. 이때, 오랫동안 혼합을 지속하게 되면 주형에 주입하기 전에 굳어질 수 있어서, 혼합물의 온도가 올라가지 전까지만 혼합

㉢ 혼합이 이루어지면 준비된 팬텀 주형에 천천히 주입하여 상온에서 완전히 굳힌 후 실험에 사용

④ 팬텀 동결절편 제작

▪ 지방조직유사 팬텀인 BSA 팬텀과 BSA 팬텀과 글리세롤 팬텀의 변성을 확인하기 위하여 동결절편을 만들어 단면을 확인

▪ 동결전편 제작 및 염색

▫ 절편 제작

㉠ 4well에 만들어진 절편을 OCT에 담가 OCT가 팬텀 내에 흡수 될 수 있도록 일정시간 동안 담가둠.

㉡ 수 분 후, 새로운 OCT에 절편을 옮겨 동결함

㉢ 동결된 절편을 동결절편제작기를 이용하여 자른 후, 슬라이드 글라스에 고정

국가연구개발 보고서원문 성과물 전담기관인 한국과학기술정보연구원에서 가공·서비스 하는 연구보고서는 동의 없이 상업적 및 기타 영리목적으로 사용할 수 없습니다

▫ 절편 염색: 팬텀내의 지방질 염색을 위하여 Oil red O 염색을 시행

㉠ 증류수로 시편을 세척함

㉡ Formalin 용액으로 1시간 시편 고정

㉢ 증류수로 세척 후, isopropanol 용액으로 5분간 반응 후 드라이기를 이용하여 시편 건조

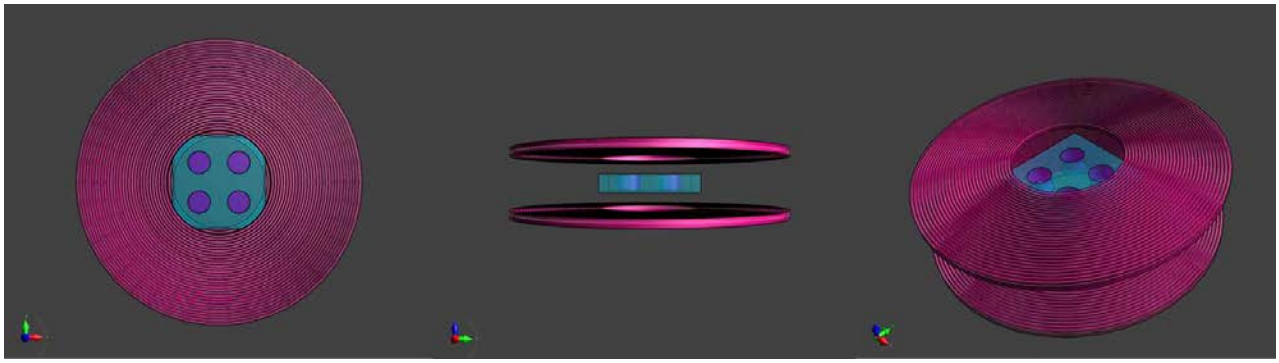
㉣ Oil Red O 용액으로 30분간 염색 후 증류수로 4번 세척한 후 현미경으로 관찰

2) 연구 결과

① 코일 디자인

㉮ Sim4Life software v2.2 (ZMT, Zurich, Switzerland) 모의실험 결과

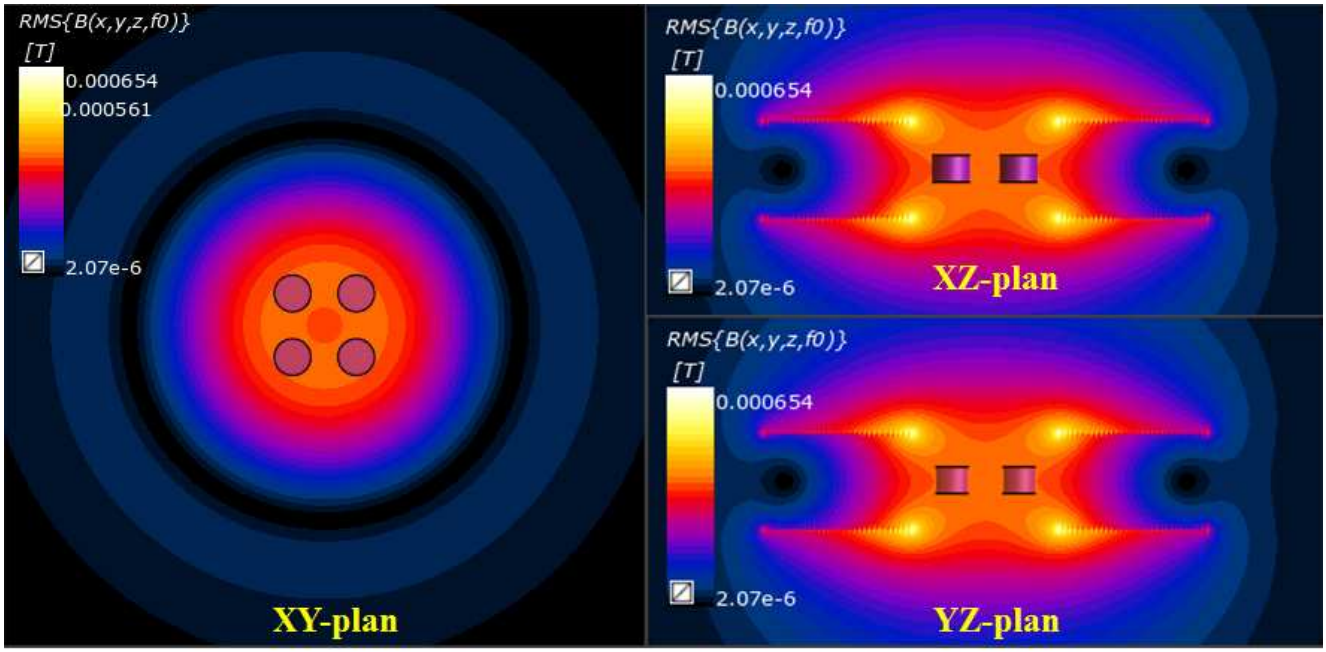
- 코일의 자극 범위를 컴퓨터 모의실험을 통해 예측함
- 4 well-plate의 크기 (60 mm × 60 mm)를 고려하여 모의실험 초기 값을 설정하고 권선 수의 변화에 따른 well-plate의 각 well에 균일한 자장이 발생되는 권선 수를 추출함
-



< 그림 23. 모의실험을 위한 모델링 >

- 관심영역에서 균일한 자기장을 형성하기 위해 필요한 권선 수는 25회~30회의 범위를 가져야 함
  - ▫ 권선 수가 25회 이하인 경우에는 시료에 형성되는 자기장이 전원의 입력에 의해 발생되는 최대 자기장에 비해 현저히 낮은 자장이 형성되어 효율성이 떨어짐
  - ▫ 30회 이상의 권선은 코일의 크기가 X, Y평면 방향으로 너무 커져 시료의 거치에 어려움이 발생되므로 권선 수의 최대치는 30회로 제한함
- 30회의 권선으로 평판나선형 코일을 제작하였을 때를 가정한 모의실험 결과를 아래의 그림 24에 나타내었으며, 4well-plate영역 (60x60 mm^2)에서 균일한 자기장을 형성하는 것을 확인하였음

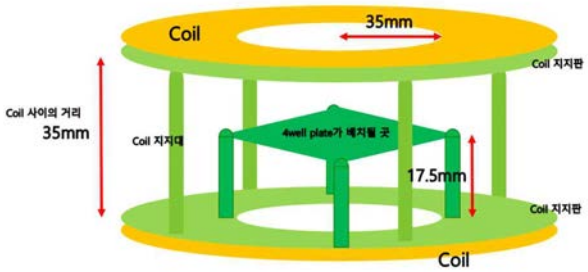
국가연구개발 보고서원문 성과물 전담기관인 한국과학기술정보연구원에서 가공·서비스 하는 연구보고서는 동의 없이 상업적 및 기타 영리목적으로 사용할 수 없습니다



< 그림 24. 모의실험 결과로 예측된 자기장 분포 (Color-map) >

㉴ 세포 시료 자극을 위한 코일 프루브 제작

- 에나멜 절연 코팅된 막대형 구리 선재(2 × 5 mm^2)를 이용하여 평판 나선형 코일을 세포 시료가 위치할 중앙 부위에 균일한 자장이 형성되도록 4well-plate의 크기 (60 × 60 mm^2)를 고려하여 내경 70 mm, 외경 180 mm의 형태로 제작함
- 쌍으로 된 평판나선형 코일을 안정적으로 지지하기 위해 거치대를 제작
  - 코일 간의 간격은 평판 나선형 코일의 내경의 반지름과 코일간의 간격이 같을 때 중앙부위에서 균일한 자장이 형성되므로 코일 내부 반지름(R)과 코일 사이의 거리가 같게 제작함
  - 두 코일 사이의 중심에 세포 자극을 위해 4well-plate 거치대를 설치하여 세포 시료가 항상 동일한 곳에서 자기장 자극을 받을 수 있도록 제작하였으며, 제작 된 코일 프루브의 모식도는 아래의 그림과 같음



< 그림 25. 코일 프루브 모식도 >

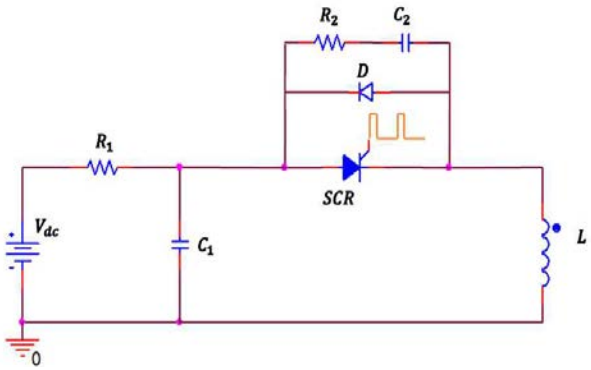
- 실제 막대형 구리 선재를 이용하여 최종 제작된 코일 프루브의 형태는 아래와 같음

국가연구개발 보고서원문 성과물 전담기관인 한국과학기술정보연구원에서 가공·서비스 하는 연구보고서는 동의 없이 상업적 및 기타 영리목적으로 사용할 수 없습니다

< 그림 26. 제작 된 코일 프루브 >

② 펄스형 전자기장 발생 시스템 (PEMF)

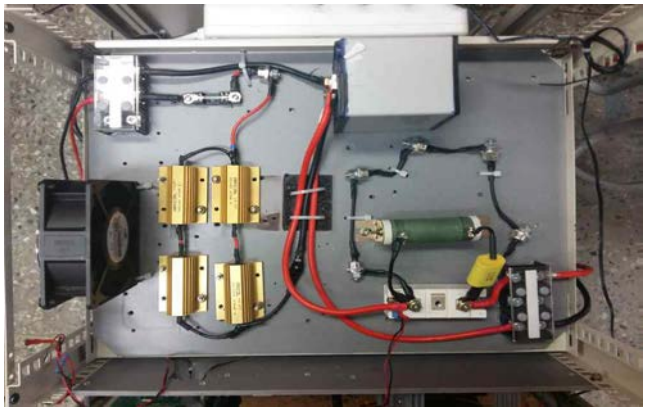
㉮ 대전류회로



< 그림 27. 대전류 회로도 >

- 자기장 발생을 위한 회로도는 그림 8과 같이 나타낼 수 있으며, 대전류 회로부분은 직류전원장치와 다이오드로 구성된 전원부, 직류전원의 전류를 충전하여 스위칭에 의해 대전류를 생성할 수 있는 고성능 캐패시터 충전부, 고자기장 발생을 위한 코일 프루브의 자기장 발생 빈도를 조절 할 수 있는 스위칭 제어부로 이루어짐
  - 전원부 : 직류전원장치(SMPS)와 다이오드로 구성
  - SMPS 정격출력 : 1,350 V, 1 A
  - 다이오드 : 고전력용 소자 사용
  - 충전부 : 입력단 저항 (R_1)은 캐패시터 입력 전류 조절 저항으로서 100 W급의 권선저항이나 방열저항을 사용하였으며, 캐패시터는 고자장을 만들기 위한 고성능 캐패시터를 이용함
  - 저항 : 100 W, 200 Ω
  - 캐패시터 : 180 μF (1000V_{dc}, 3200A_{peak})
  - 스위칭 제어부 : SCR(사이리스터)를 On/Off 시키기 위한 펄스를 인가하기 위한 부분으로, 자극 주기의 변화가 용이할 수 있도록 SCR 트리거 모듈을 개발하여 On/Off을 1 μs 단위로 조절 할 수 있도록 하였음
- 실제 제작된 대전류 회로는 아래와 그림 28과 같으며 전류제어 저항의 발열을 줄이기 위하여 팬을 이용하여 냉각하였음

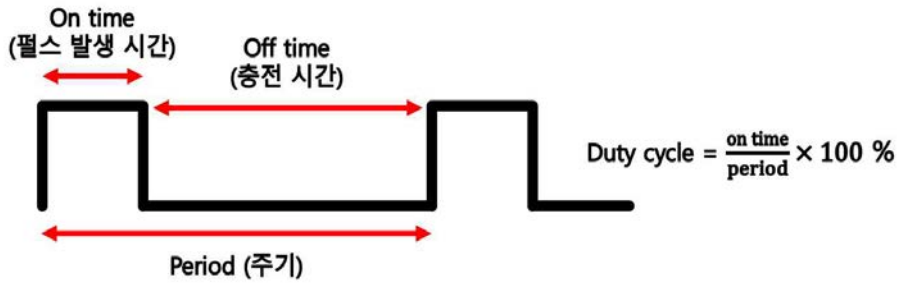
국가연구개발 보고서원문 성과물 전담기관인 한국과학기술정보연구원에서 가공·서비스 하는 연구보고서는 동의 없이 상업적 및 기타 영리목적으로 사용할 수 없습니다



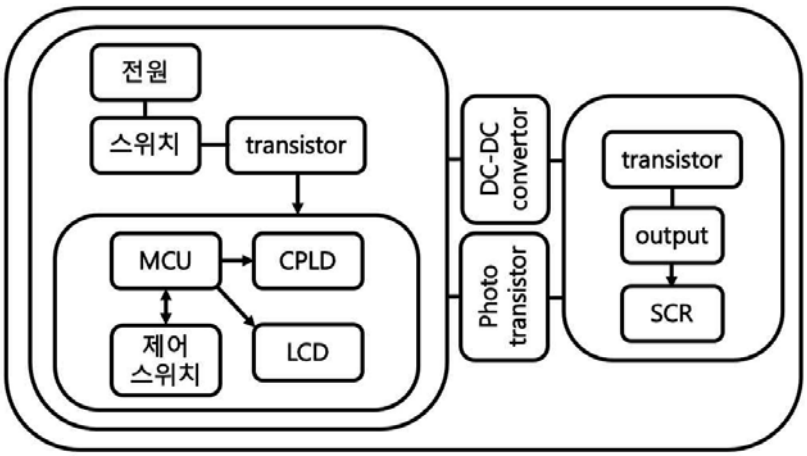
< 그림 28. 제작된 대전류 회로 >

㉰ PEMF 제어를 위한 SCR 트리거 모듈 개발

- 코일 프루브에서 시변 자기장을 발생하기 위한 SCR 트리거 신호는 세포 시료를 자극하기 위한 중요한 변수임
- 아래의 그림 29와 같이 on/off 시간을 조절하였으며 대전류회로와 절연을 위해 포토트랜지스터를 이용해서 전원을 분리하여 구성하였음 (그림 30)



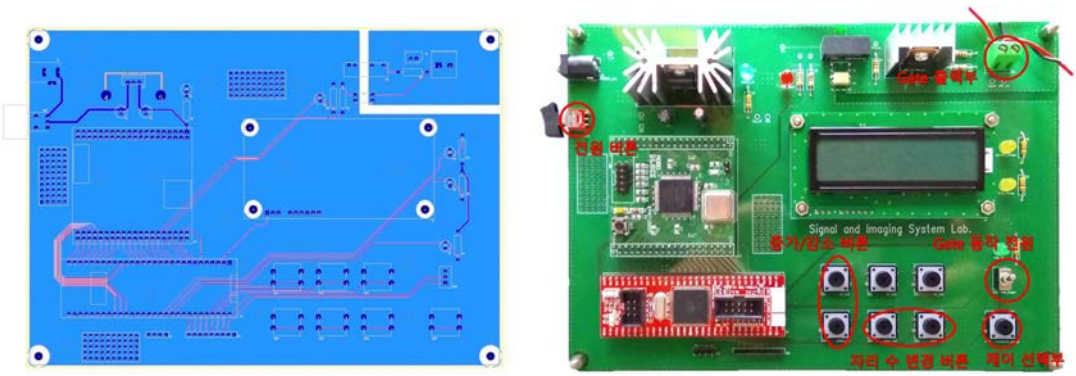
< 그림 29. on/off 시간 조절 개념도 >



< 그림 30. SCR 시스템 블록도 >

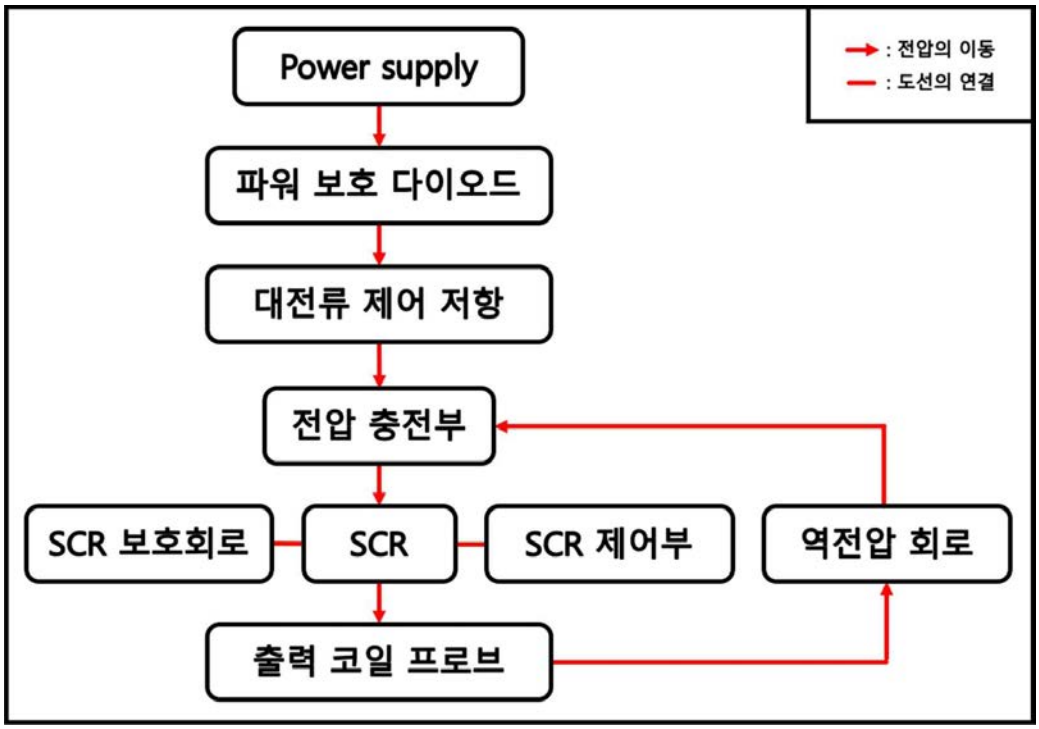
- 실제 SCR 트리거 모듈을 제작하기 위해 PCB를 설계하여 제작하였음

국가연구개발 보고서원문 성과물 전담기관인 한국과학기술정보연구원에서 가공·서비스 하는 연구보고서는 동의 없이 상업적 및 기타 영리목적으로 사용할 수 없습니다



<그림 31. SCR 트리거 모듈 PCB artwork와 실제 제작한 모듈 >

- 최종적으로 제작한 시스템은 아래와 같이 구성하였음

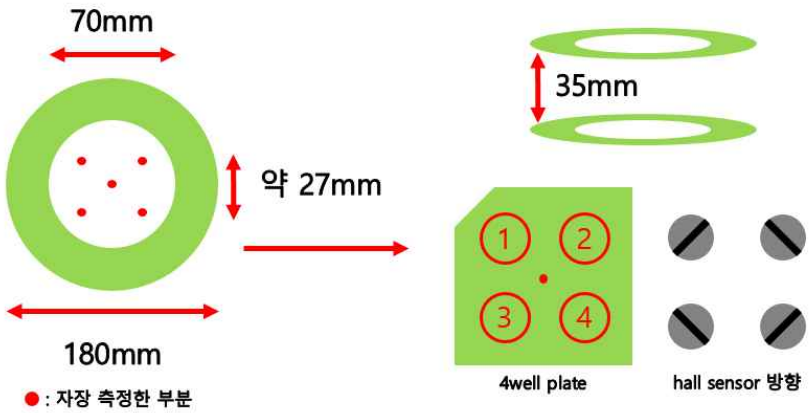


< 그림 32. 최종 시스템 >

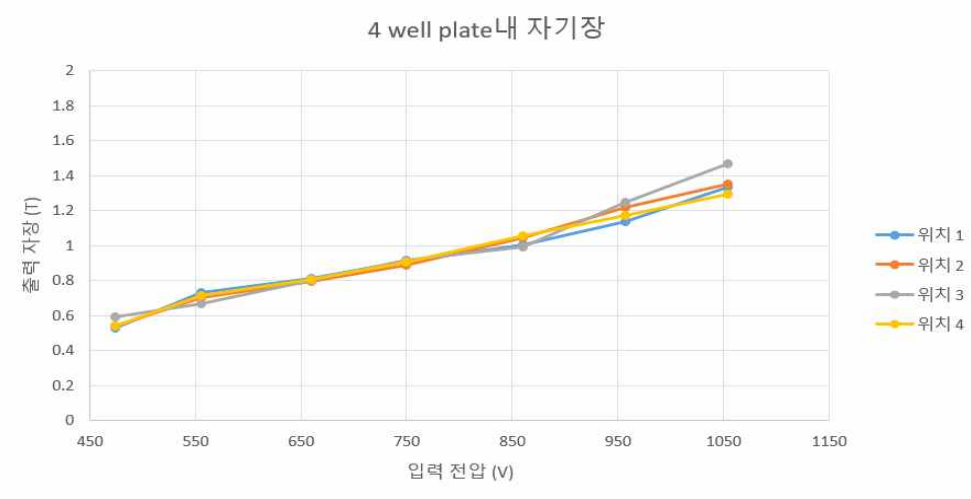
㉰ 자기장 측정 및 평가

- 세포 시료가 위치한 곳에의 자기장 세기는 가우스 미터기로 측정하여 시스템을 평가하고 검증함
- 아래의 그림 33과 같은 방법으로 코일 프루브 내 자기장을 측정하여 출력에 따른 자장의 변화를 관찰함

국가연구개발 보고서원문 성과물 전담기관인 한국과학기술정보연구원에서 가공·서비스 하는 연구보고서는 동의 없이 상업적 및 기타 영리목적으로 사용할 수 없습니다



< 그림 33. 4well-plate 내 자기장 측정방법 >



< 그림 34. well 위치에 따른 자기장>

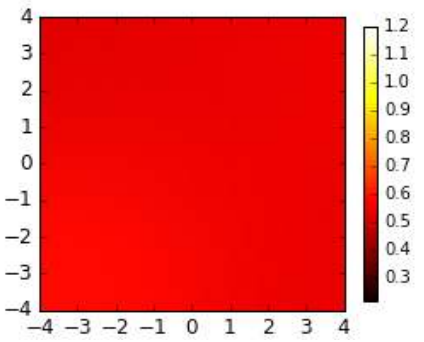
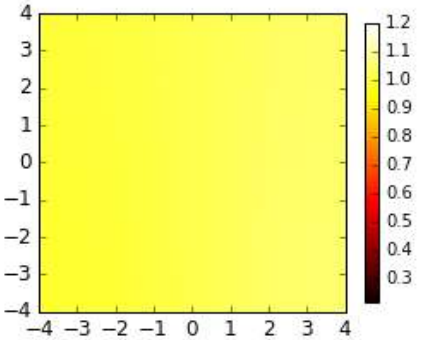
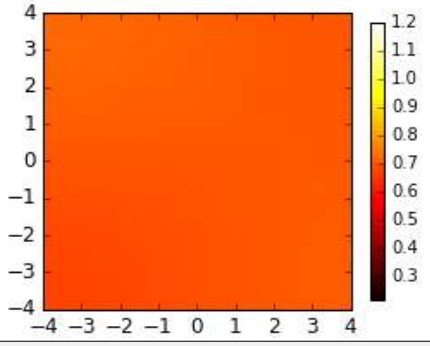
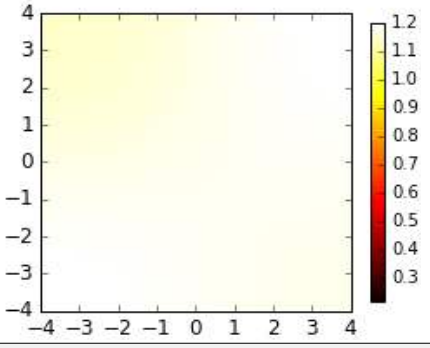
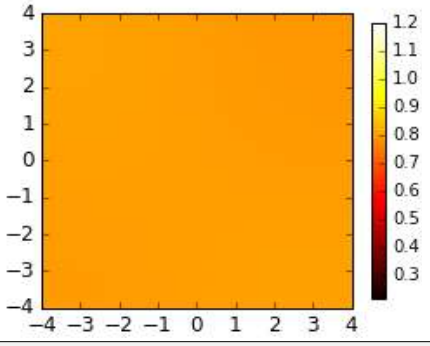
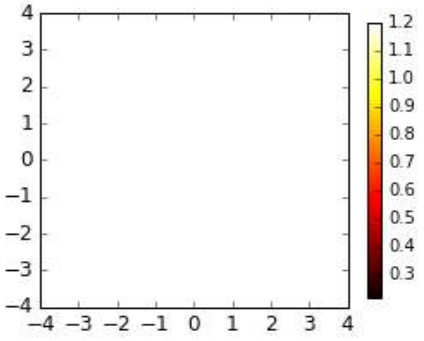
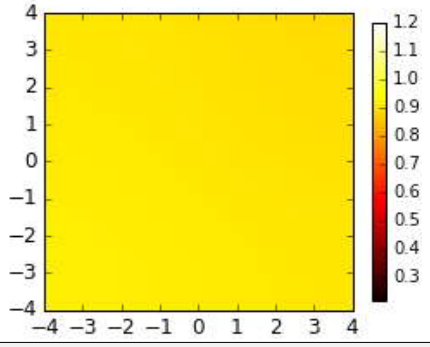
- 입력 전압에 따른 시료 내에 형성되는 자기장을 측정한 데이터 (표 8)로 그림 34에 입력 전압에 따라 자기장이 선형적으로 증가 되는 것을 보였다.
- 표 9에 상기 측정된 자기장 분포를 2D color-map으로 나타내어 시료 내에서 균일한 자기장을 형성하는 것을 확인 함.

< 표 8. 4well-plate 위치별 자기장 세기 >

입력전압 (V)	위치1(T)	위치2(T)	위치3(T)	위치4(T)	평균	표준편차
470	0.530	0.542	0.593	0.540	0.551	0.028
560	0.730	0.701	0.670	0.713	0.704	0.025
660	0.811	0.793	0.800	0.806	0.803	0.007
750	0.909	0.890	0.919	0.906	0.906	0.012
860	1.004	1.047	0.993	1.057	1.025	0.031
960	1.138	1.218	1.246	1.170	1.193	0.048
1050	1.334	1.353	1.470	1.292	1.362	0.076

국가연구개발 보고서원문 성과물 전담기관인 한국과학기술정보연구원에서 가공·서비스 하는 연구보고서는 동의 없이 상업적 및 기타 영리목적으로 사용할 수 없습니다

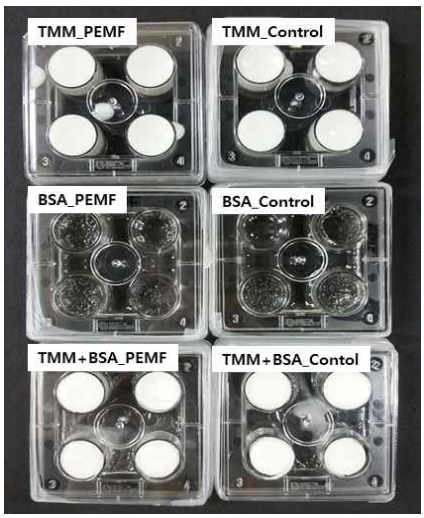
< 표 9. 입력전압에 따른 코일 프루브 내 자장분포>

전압(V)	Color map [평균 ± 표준편차, (T)]	전압(V)	Color map [평균 ± 표준편차, (T)]
470		860	
	0.551 ± 0.028		1.025 ± 0.031
560		960	
	0.704 ± 0.025		1.193 ± 0.048
660		1050	
	0.803 ± 0.007		1.362 ± 0.076
750			
	0.906 ± 0.012		

국가연구개발 보고서원문 성과물 전담기관인 한국과학기술정보연구원에서 가공·서비스 하는 연구보고서는 동의 없이 상업적 및 기타 영리목적으로 사용할 수 없습니다

③ 팬텀 실험 결과

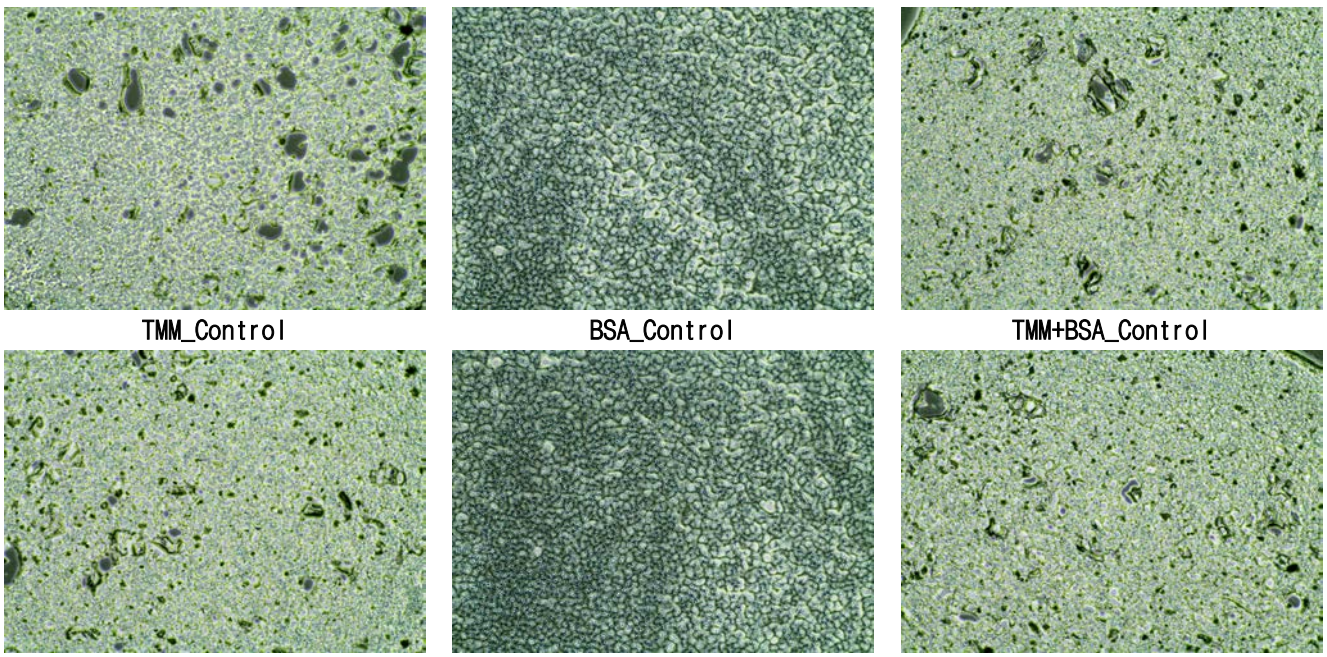
- PEMF 자극을 위하여 제작한 팬텀 용액을 4-well plate에 부어 굳힘
- PEMF 자극 후 결과
  - 자극 전 후의 팬텀의 물질변성 여부를 확인하기 힘듦
  - PEMF 자극 기전 상 혈관 등의 생체 시스템의 대사활동 증가로 인하여 주위 지방과 조직에 자극을 가하게 되는데 팬텀 내 혈관 등의 생체 시스템에 관류 시스템이 존재 하지 않아 신진대사 증가 등의 결과를 기대할 수 없으므로 팬텀의 물질변성에 영향을 미치지 않은 듯함



PEMF 자극을 위한 팬텀: 4-well plate

Well에서 빼낸 각 팬텀

< 그림 35. 자기장 자극을 위하여 제작된 팬텀 >



TMM_Control　　BSA_Control　　TMM+BSA_Control

TMM_PEMF　　BSA_TMM　　TMM+BSA_PEMF

< 그림 36. 자기장 자극 전(상)과 후(하)의 팬텀 절편 >

국가연구개발 보고서원문 성과물 전담기관인 한국과학기술정보연구원에서 가공·서비스 하는 연구보고서는 동의 없이 상업적 및 기타 영리목적으로 사용할 수 없습니다

3) 결론 및 고찰

- 컴퓨터 모의실험을 바탕으로 제작한 코일의 출력 자장이 세포시료 영역 내에서 균일함을 확인함
  - 4 well plate 내 시료를 표준편차 약 5% 미만의 균일한 자장으로 자극할 수 있음
  - 이러한 결과를 통해 시뮬레이션을 기반으로 한 코일 제작의 유효성을 확인
- 제작된 대전류 회로로부터 원하는 자극 주파수와 자기장 강도 및 시간을 제어하고 안정적으로 출력할 수 있음을 확임
  - 입력 전압에 따라 출력 자기장의 강도가 선형적으로 변함을 확인
  - 주파수와 자기장 강도 및 시간이 장치의 안정성에 영향을 주지 않음을 확인
  - 다양한 조건에 따른 세포 자극 실험 수행이 가능한 장치임을 확인
- 대전류 회로 및 세포 자극 코일 프로브 최적화가 필요
  - 대전류 회로의 gate 부분 보호를 위한 고가의 보호회로가 제작됨
  - 경제적인 보호회로 설계가 필요함
  - 세포 자극 코일 프로브에 높은 전류가 흐름에 따라 진동과 열이 발생하게 됨
  - 진동을 해결할 수 있는 방법과 열을 제거하기 위한 쿨링 시스템이 필요함
- 조직 모사 팬텀을 이용한 자기자극 실험은 현미경상으로 큰 변화를 확인하지 못함
  - PEMF 자기자극은 실제 인체 내에서 혈류, 세포 사이의 신호 전달 등을 통하여 자극의 효과가 나타나는데 조직 모사 팬텀의 경우는 그러한 생체모사 환경을 구성하지 못하여 효과가 미미한 것으로 사료됨

(2) PEMF 자극 시 세포에 따른 자극 효과 확인

■ 3가지 종류의 세포에 PEMF 자극 시 자극 효과의 차이를 확인 및 비교 분석하여 PEMF 효과 검증

1) 연구 방법

① 연골세포에서의 변화관찰

- 세포 배양
  - 연골세포: Chondrocyte #3
  - New Zealand White Rabbit의 femur와 tibia의 연골에서 primary culture
  - 파종농도: $1x10^4$/ml의 농도로 4-well plate에 파종
  - 기본배지: Dulbecco's Modified Eagle's Medium-high glucose (DMEM-HG; Gibco, USA)
  - 샘플: 대조군-전자기장 자극 무 (n=3), 실험군-전자기장 자극 유무 (n=3)
  - PEMF 자극
  - 파종 후, 3일 이후부터 자극을 시행, 자극은 7일 동안 진행 (총 배양일: 10일)
- 연골세포 증식율 및 생존율:MTT assay 방법 사용
  - Cell Proliferation Kit Ⅰ, MTT(Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) 사용
  - 595nm의 파장의 ELISA reader(Thermo Scientific Inc., USA)를 이용하여 흡광도 측정
  - 실험군의 흡광도 측정값을 대조군의 흡광도 측정값에 대한 백분율 값으로 나타내어 세포 생존율을 계산
  - $\text{세포 생존율}(\%) = \frac{\text{실험군}}{\text{대조군}} \times 100$

② 지방조직(공배양세포)에서의 변화

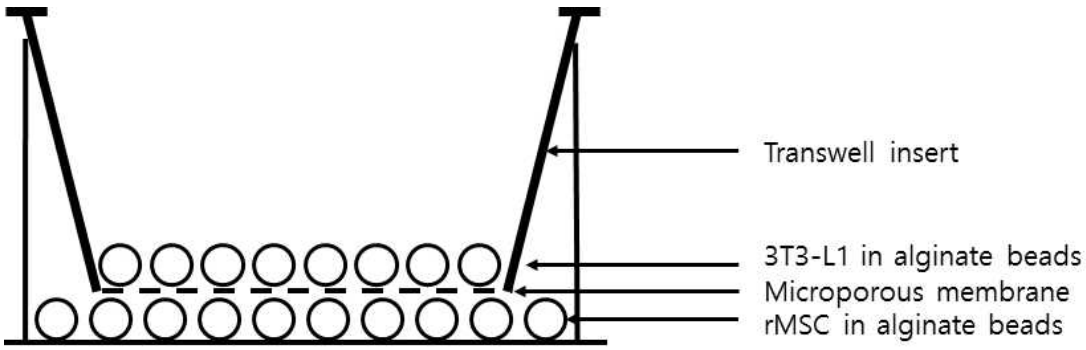
- 세포 배양

국가연구개발 보고서원문 성과물 전담기관인 한국과학기술정보연구원에서 가공·서비스 하는 연구보고서는 동의 없이 상업적 및 기타 영리목적으로 사용할 수 없습니다

▫ 지방세포
- 3T3-L1: 한국세포주은행에서 구매
- 파종농도: 1x10^5/ml의 농도로 약 3mm 구형의 1.2(v/v)% alginate bead 제작
- 기본배지: Dulbecco's Modified Eagle's Medium-high glucose (DMEM-HG; Gibco, USA)

▫ 줄기세포:rMSC(rabbit primary culture)
- rMSC: New Zealand White Rabbit의 femur와 tibia의 골수에서 primary culture
- 파종농도: 5x10^4/ml의 농도로 약 3mm 구형의 1.2(v/v)% alginate bead 제작
- 기본배지: Dulbecco's Modified Eagle's Medium-Low glucose (DMEM-LG; Gibco, USA)

▫ 지방세포와 줄기세포의 공배양 (co-culture)
- 지방세포와 줄기세포의 위의 방법으로 alginate bead를 제작 후 각 0.5ml의 용량을 1:1로 혼합하여 파종 (최종 세포 농도: 지방세포 5x10^4/ml, 줄기세포 2.5x10^4/ml)
- rMSC가 있는 alginate bead는 24-well plate 바닥에 깔고 3um polyethylene terephthalate track-etched membrane을 이용하여 3T3-L1 세포가 있는 alginate bead를 상층에 넣고 3차원 공배양 시스템을 마련



< 그림 37. 공배양 시스템 모식도 >

▪ 지방 분화 : 지방분화배지는 3일, 지방유지배지는 1일의 간격으로 번갈아 교체하며 지방분화를 유도함(표 10, 표 11)

▫ 1사이클 = 지방분화 배지 3일 + 지방유지 배지 1일 = 4일

< 표 10. 지방분화 배지 구성 물질 >

물질	함유량
Fetal Bovine Serum (FBS; HyClone, Logan, UT, USA)	10 %
antibiotics (penicillin)	100U/㎖
antibiotics (stereptomycin, Gibco)	100㎍/㎖
Insulin (Sigma)	10㎍/㎖
3-Isobutyl-1-methylxanthine (IBMX; Sigma)	0.5mM
Dexamethasone (Sigma)	1μM
Indomethacin (Sigma)이 포함된 Dulbecco's Modified Eagle's Medium-high glucose (DMEM-HG; Gibco, USA)	0.1mM

국가연구개발 보고서원문 성과물 전담기관인 한국과학기술정보연구원에서 가공·서비스 하는 연구보고서는 동의 없이 상업적 및 기타 영리목적으로 사용할 수 없습니다

< 표 11. 지방유지 배지 구성 물질 >

물질	함유량
Fetal Bovine Serum (FBS; HyClone, Logan, UT, USA)	10 %
antibiotics (penicillin)	100U/㎖
antibiotics (stereptomycin, Gibco)	100㎍/㎖
Insulin (Sigma)이 포함된 Dulbecco's Modified Eagle's Medium-high glucose (DMEM-HG; Gibco, USA)	10㎍/㎖

- Nile red 염생을 통한 생화학적 검증
  - 염색을 통하여 공배양세포의 지방분화 정도를 형태학적으로 관찰함
  - 염색 방법
  ㉠ 1mg/ml(in acetone)의 농도로 Nile red stock 용액을 제조
  ㉡ PBS로 시편을 세척한 후, Formalin 용액으로 1시간 시편 고정
  ㉢ 먼저 만들어 놓은 stock 용액을 1:100으로 희석하여 세포에 첨가 후 10분간 반응시킴
  ㉣ 반응 후, 증류수로 염색약을 세척한 다음 형광 현미경으로 관찰

③ 지방세포와 줄기세포 분화 시 변화
- 세포 배양
  - 지방세포:3T3-L1(한국세포주은행)
  - 파종농도: $1x10^5$/well (24well-plate)
  - 기본배지: Dulbecco's Modified Eagle's Medium-high glucose (DMEM-HG; Gibco, USA)
  - 줄기세포: rMSC(rabbit primary culture)
  - 파종농도: $5x10^4$/well (24well-plate)
  - 기본배지: Dulbecco's Modified Eagle's Medium-Low glucose (DMEM-LG; Gibco, USA)
- 지방 분화 : 지방분화는 공배양세포와 동일한 배지를 사용하여 유도함
  - 1사이클 = 지방분화 배지 3일 + 지방유지 배지 1일 = 4일
- Oil Red O 염색을 통한 생화학적 검증
  - 염색을 통하여 hMSCs의 지방 분화 과정을 형태학적으로 관찰함
  - 염색 방법 서술
  ㉠ PBS로 시편을 세척함
  ㉡ Formalin 용액으로 1시간 시편 고정
  ㉢ 증류수로 세척 후, isopropanol 용액으로 5분간 반응 후 드라이기를 이용하여 시편 건조
  ㉣ Oil Red O 용액으로 30분간 염색 후 증류수로 4번 세척한 후 현미경으로 관찰

④ 줄기세포의 지방 분화 시 지방 분화 억제 효과 측정 및 분석
- 개발된 자기장 발생 장치를 이용하여 자극 프로토콜에 따른 지방분화 줄기세포의 변화를 관찰
  - 자기장의 세기, 자극시간을 변수로 하여 지방세포의 변화 관찰
- 세포 시료 제작 방법
  - 줄기세포:rMSC(rabbit primary culture)
  - rMSC: New Zealand White Rabbit의 femur와 tibia의 골수에서 primary culture

국가연구개발 보고서원문 성과물 전담기관인 한국과학기술정보연구원에서 가공·서비스 하는 연구보고서는 동의 없이 상업적 및 기타 영리목적으로 사용할 수 없습니다

- 세포 파종 농도: 1x10^4/well (4-well plate)
- 세포 배양 방법: 표 10, 표 11에서 명시한 성장인자를 DMEM-HG(1% FBS, 1% antibiotic)에 첨가한 분화배지를 이용하여 지방분화

▪ Oil Red O 염색을 통한 생화학적 검증

2) 연구 결과

① 연골세포에서의 세포 증식 효과

▪ 개발된 자기장 발생 장치를 이용하여 자극 프로토콜에 따른 연골세포의 변화를 관찰 (그림 38)

▫ 문헌조사로 연골세포가 증식 가능한 반복 주기와 시간을 설정함 (1차년도와 동일한 프로토콜)

▫ 자기장의 세기, 자극시간을 변수로 하여 연골세포의 변화 관찰

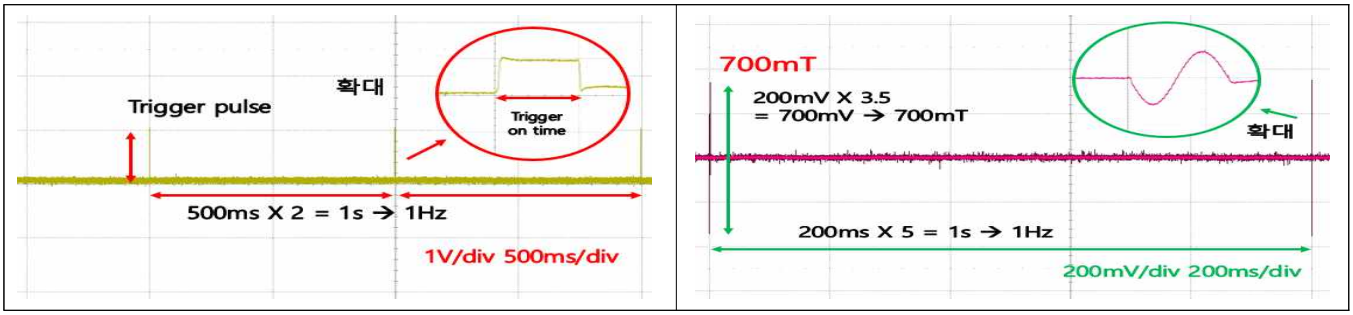
▪ 연골세포 자극을 위한 자극 프로토콜 및 실험 사진 (그림 38-39)

▫ 자극 프로토콜 : 10㎐(on time : 100 ㎲ off time : 99900 ㎲, 자기장 세기 : 300/500/700 mT)

▫ 목표: 연골세포 대조군과 전자기장 자극한 세포 실험군 사이의 세포 증식의 유의한 차이 확인

- 세포 파종 3일 후 안정된 후부터 자극 시작
- 자극 조건: 10분/일, 60분/일, 7일간 자극 후 MTT assay로 증식 유무 확인

< 그림 38. 코일 프루브 내 세포시료 자극 사진 >



<그림 39. 연골세포 자극 트리거 신호 및 자기장 파형 >

▪ 연골세포 자극 결과

▫ 연골세포를 7일간 자극한 후에 MTT assay로 증식 유무를 확인하였음 (표12, 그림 40-41)

▫ 자기장 자극을 받은 일부 실험군이 대조군에 비해 유의하게 증식하는 경향을 확인하였음

- 자기장 강도에 따른 세포 증식을 확인하였을 때 0.3 T, 0.7 T에서 증식이 더 잘되는 경향이 있었으

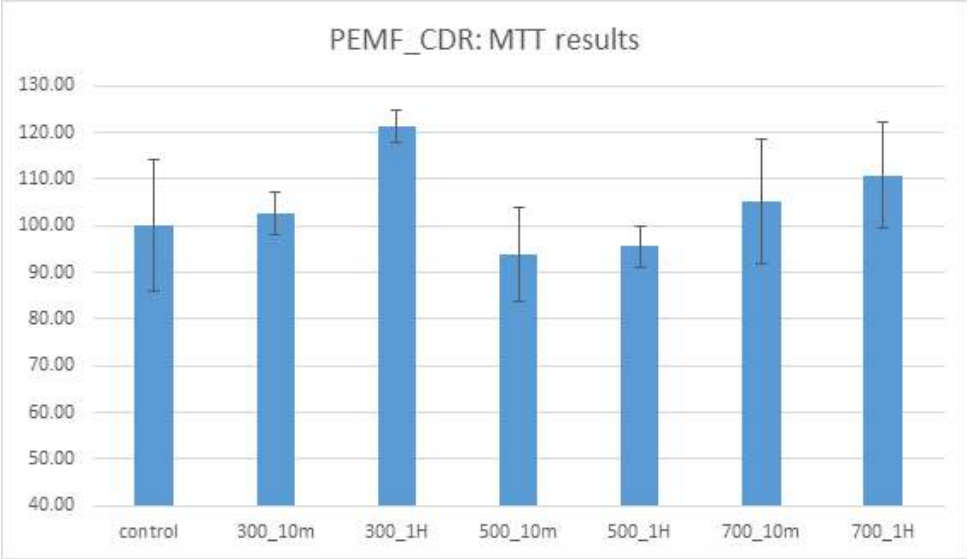
국가연구개발 보고서원문 성과물 전담기관인 한국과학기술정보연구원에서 가공·서비스 하는 연구보고서는 동의 없이 상업적 및 기타 영리목적으로 사용할 수 없습니다

며, 0.3 T로 60분 자극하였을 때 대조군과 유의한 차이($P < 0.05$)를 보였음

- 0.5 T에서는 대조군에 비해 증식이 덜 되었으나 통계적으로 유의한 수준을 보이는 차이는 나타나지 않았음
- 동일한 자기장 강도의 실험군 내에서는 10분 자극에 비해 60분을 자극한 군의 증식이 더 잘되었음
- 대조군과 실험군으로 단순 나누어 비교하였을 때 자기장을 자극을 준 연골세포군이 대조군에 비해 약 15% 증식이 잘되는 것으로 확인됨

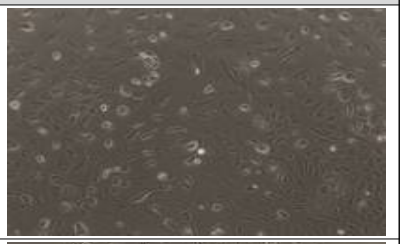
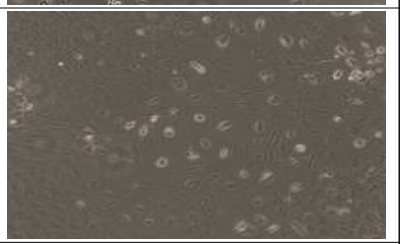
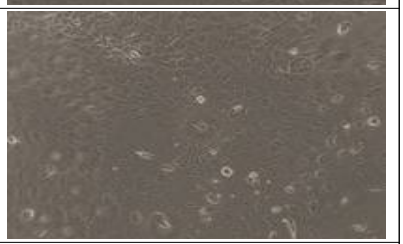
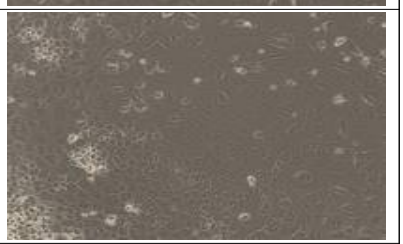
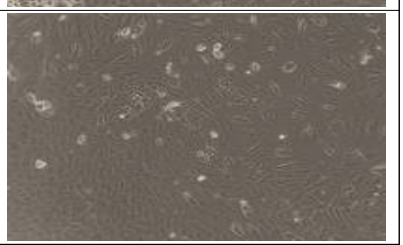
< 표 12. 자극 조건에 따른 세포 증식율 비교 >

	시료		증식율(%)	표준편차
대조군	자극 없음		100.00	0.141
실험군	300mT	10분	102.75	0.046
		60분	121.25	0.035
	500mT	10분	93.86	0.102
		60분	95.54	0.044
	700mT	10분	105.15	0.135
		60분	110.81	0.114



< 그림 40. 자극에 따른 세포증식 (MTT assey) 결과 >

국가연구개발 보고서원문 성과물 전담기관인 한국과학기술정보연구원에서 가공·서비스 하는 연구보고서는 동의 없이 상업적 및 기타 영리목적으로 사용할 수 없습니다

		1일차	7일차
대조군			
300mT	10분		
	60분		
500mT	10분		
	60분		
700mT	10분		
	60분		

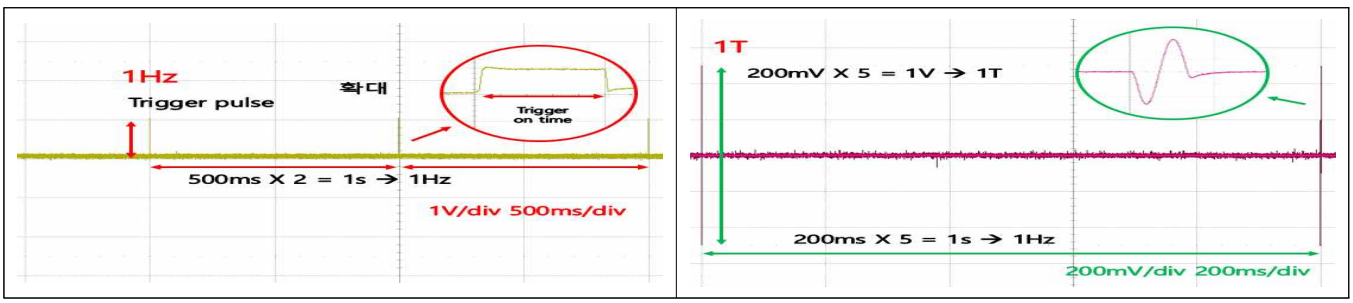
< 그림 41. 자기장 자극을 가한 연골세포의 현미경사진 >

국가연구개발 보고서원문 성과물 전담기관인 한국과학기술정보연구원에서 가공·서비스 하는 연구보고서는 동의 없이 상업적 및 기타 영리목적으로 사용할 수 없습니다

② 지방세포 및 조직(공배양세포)에서의 자극 조건 확립

- 개발된 자기장 발생 장치를 이용하여 자극 프로토콜에 따른 지방세포 및 공배양세포의 변화를 관찰 (그림 42)
  - 자기장의 세기, 자극시간을 변수로 하여 지방세포의 변화 관찰
- 지방세포 및 공배양세포 자극을 위한 자극 프로토콜 및 실험 사진 (그림 43)
  - 자극 프로토콜 : 10㎐(on time : 100 ㎲ off time : 99900 ㎲, 자기장 세기 : 300/500/700 mT
  - 목표: 연골세포 대조군과 전자기장 자극한 세포 실험군 사이의 세포 증식의 유의한 차이 확인
    - 세포 파종 3일 후 안정된 후부터 자극 시작
    - 자극 조건: 10분/일, 60분/일, 7일간 자극 후 Oil red O 염색으로 분화 유무 확인

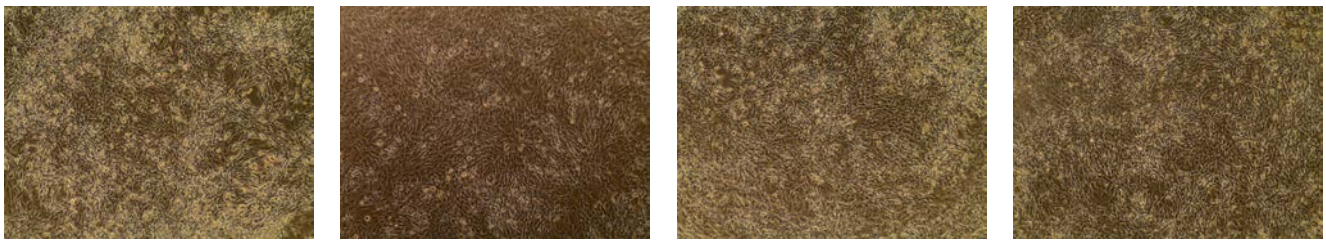
< 그림 42. 자기자극 코일 프루브 내 세포시료 사진 >



< 그림 43. 지방세포 및 조직(공배양세포) 자극 트리거 신호 및 자기장 파형 >

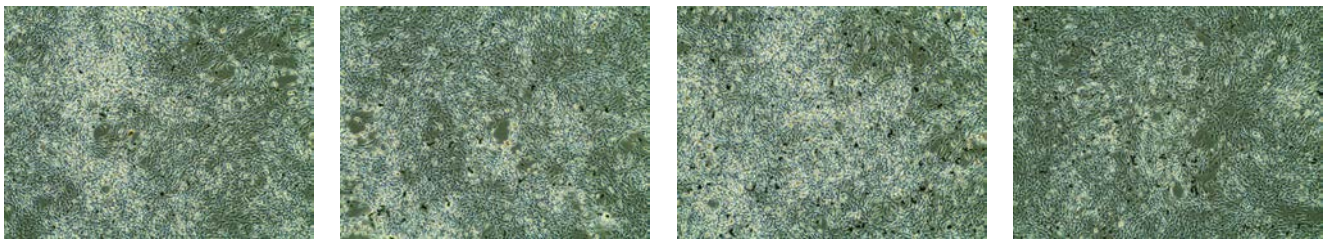
- 지방세포 및 공배양 세포 자극 결과
  - 지방세포와 공배양세포의 경우 모두 지방 분화를 시작한지 5일 이후에 염색을 진행
    - 세포 파종 3일 후 안정된 후부터 자극 시작
    - 자극 조건: 10분/일, 60분/일, 7일간 자극
  - 지방세포 및 공배양 세포 전자기장 자극 결과
    - 지방세포와 공배양세포를 를 5일간 자극한 후 Oil red O와 Nile red 염색을 통하여 지방분화를 확인
    - 염색 후 세포의 지방 분화 정도를 현미경으로 확인하였을 때, 지방세포의 경우 대조군과 전자기장 자극 1일, 3일 시편에서는 차이가 없었으나, 5일차 시편에서는 대조군에 비하여 지방분화 정도가 미미한 것을 확인 (그림 44)
    - 공배양세포의 경우 분화된 rMSC alginate bead의 염색 사진을 첨부하였음.(그림 45) 이때의 지방분화 정도는 대조군과 다른 실험 군들에 비하여 차이가 미미하였으며 유의한 차이를 보이지 않음
    - 차후 심화된 실험을 통하여 자극 전 후의 지방분화 정도를 정량적으로 나타낼 계획임

국가연구개발 보고서원문 성과물 전담기관인 한국과학기술정보연구원에서 가공·서비스 하는 연구보고서는 동의 없이 상업적 및 기타 영리목적으로 사용할 수 없습니다



(a) 대조군 (b) 전자기장 자극 1일 (c) 전자기장 자극 3일 (d) 전자기장 자극 5일

< Oil Red O 염색 전 >



(a) 대조군 (b) 전자기장 자극 1일 (c) 전자기장 자극 3일 (d) 전자기장 자극 5일

< Oil Red O 염색 후 >

< 그림 44. 지방세포 현미경 사진 >

(a) 염색 전 (b) 전자기장 자극 5일

< rMSC alginate bead >

< 그림 45. 공배양세포 Nile red 염색 현미경 사진 >

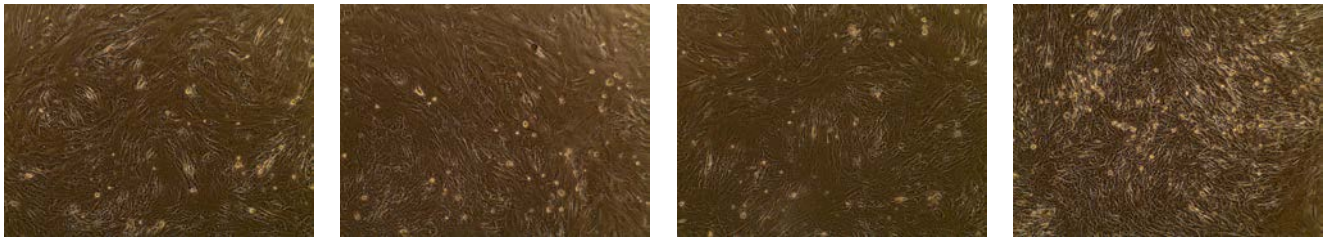
③ 줄기세포의 지방 분화 시 지방 분화 억제 효과 측정 및 분석

- 개발된 자기장 발생 장치를 이용하여 자극 프로토콜에 따른 지방분화 줄기세포의 변화를 관찰
  - 자기장의 세기, 자극시간을 변수로 하여 지방세포의 변화 관찰
- 지방분화 줄기세포의 자극을 위한 자극 프로토콜
  - 자극 프로토콜 : 10㎐(on time : 100 ㎲ off time : 99900 ㎲, 자기장 세기 : 300/500/700 mT
  - 목표: 연골세포 대조군과 전자기장 자극한 세포 실험군 사이의 세포 증식의 유의한 차이 확인
    - 세포 파종 3일 후 안정된 후부터 자극 시작
    - 자극 조건: 10분/일, 60분/일, 7일간 자극 후 Oil red O 염색으로 분화 유무 확인
- 지방분화 줄기세포 자극 결과
  - 지방분화 줄기세포의 경우 모두 지방 분화를 시작한지 5일 이후에 염색을 진행 (그림 46)
    - 세포 파종 3일 후 세포가 안정된 후부터 자극 시작
    - 자극 조건: 10분/일, 60분/일, 7일간 자극 후 Oil red O 염색으로 분화 유무 확인

국가연구개발 보고서원문 성과물 전담기관인 한국과학기술정보연구원에서 가공·서비스 하는 연구보고서는 동의 없이 상업적 및 기타 영리목적으로 사용할 수 없습니다

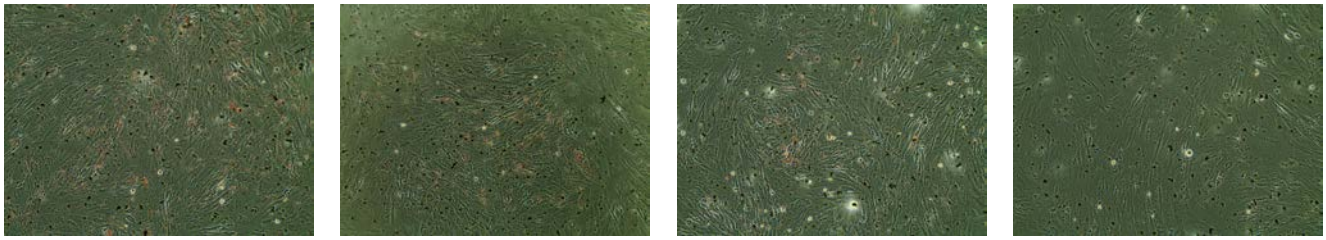
▫ 지방분화 줄기세포 전자기장 자극 결과

- 지방분화 줄기세포를 5일간 자극한 후 Oil red O 염색을 통하여 지방분화를 확인
- 염색 후 세포의 지방 분화 정도를 현미경으로 확인하였을 때, 대조군과 전자기장 자극 1일, 3일 시편에서는 차이가 확인 되지 않았으나. 5일차 시편에서는 대조군에 비하여 지방분화 정도가 미미한 것을 확인 (그림 46 (d), (h))
- 차후 심화된 실험을 통하여 자극 전 후의 지방분화 정도를 정량적으로 나타낼 계획임



(a) 대조군 (b) 전자기장 자극 1일 (c) 전자기장 자극 3일 (d) 전자기장 자극 5일

< Oil Red O 염색 전 >



(e) 대조군 (f) 전자기장 자극 1일 (g) 전자기장 자극 3일 (h) 전자기장 자극 5일

< Oil Red O 염색 후 >

< 그림 46. 지방분화 줄기세포 현미경 사진 >

3) 결론 및 고찰

- PEMF 자극은 1차년도의 결과와 동일하게 연골세포의 경우 대조군에 비해 유의하게 증식하는 경향을 확인하였음
  - ▫ 자기장의 세기, 자극 시간에 따라 증식의 경향이 다름을 확인함
  - ▫ 본 연구에서는 자기장의 세기보다는 자극이 시간이 세포 증식에 미치는 영향이 큰 것으로 결론을 내릴 수 있음
- 지방세포의 경우 전자기장 자극 실험군에서 대조군에 비하여 지방분화 정도가 미미한 것을 확인
  - ▫ 이는 현미경상으로도 확인되는 결과로써 전자기장 자극이 지방 억제에 도움이 된다는 것을 보여주고 있음
- 반면, 지방세포와 줄기세포의 공배양 결과에서는 대조군과 실험군 사이의 차이가 확인되지 않음
  - ▫ 공배양 세포의 변화를 관찰하기에는 자극 기간과 분화 기간의 설정이 적합하지 않았던 것으로 사료됨
- 줄기세포의 지방 분화시 전자기장 자극이 지방분화 억제에 도움이 됨을 확인하였음
  - ▫ 대조군과 실험군의 차이가 초기에는 잘 나타나지 않았지만 분화 및 자극 기간이 길어짐에 따라 그 차이도 크게 나타나는 것을 확인할 수 있었음
  - ▫ 그러나, 본 연구 결과는 모두 육안상 진행하였으므로 차후 지방분화의 차이를 정량적으로 나타낼 것임 (3차년도에 추가 진행하여 연구결과를 나타내었음)

국가연구개발 보고서원문 성과물 전담기관인 한국과학기술정보연구원에서 가공·서비스 하는 연구보고서는 동의 없이 상업적 및 기타 영리목적으로 사용할 수 없습니다

(3) 기타 실험: D_2O 노출 시간에 따른 세포 독성

■ 연속적 NMR 측정법 개발에 적용될 NMR Locking 용액의 세포 독성을 확인함

1) 연구 방법

※ 차년도의 NMR 측정에서 NMR locking 용액인 D_2O에의 노출 시간에 따른 세포 독성 선행 연구

- 세포 배양
  - 줄기세포: rMSC(rabbit primary culture)
    - 파종농도: $1x10^6$/ml의 농도로 1.2(v/v)% alginate bead 제작
    - 기본배지: Dulbecco's Modified Eagle's Medium-Low glucose (DMEM-LG; Gibco, USA)
- 실험 그룹: 세포 배양 시 배지의 조성을 달리하여 D_2O 노출 시간에 따른 세포 독성 평가 (표 3)
  - 세포 배양 시 한 well에 들어가는 배지의 양은 1ml로 고정
  - 100% D_2O와 50% D_2O 조건에서 NMR 정량측정 시 기준 물질로 사용하는 1mM TSP의 독성 여부도 관측

< 표 13. D_2O 독성 평가를 위한 배지 조성>

그룹	배지 조성
대조군	100% DMEM-HG
실험군	1) 100% D_2O
	2) 100% D_2O + 1mM TSP
	3) 50% D_2O + 50% Saline (1:1 혼합)
	4) 50% D_2O + 50% Saline + 1mM TSP (1:1 혼합)

  - D_2O 노출시간: 1, 2, 3, 6, 12, 24 시간
    - 노출 후 즉시 MTT assay를 시행하여 세포 생존율 측정
- 세포 증식율 및 생존율: MTT assay
  - Cell Proliferation Kit Ⅰ, MTT(Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) 사용
    - 연골세포 증식율 측정법과 동일

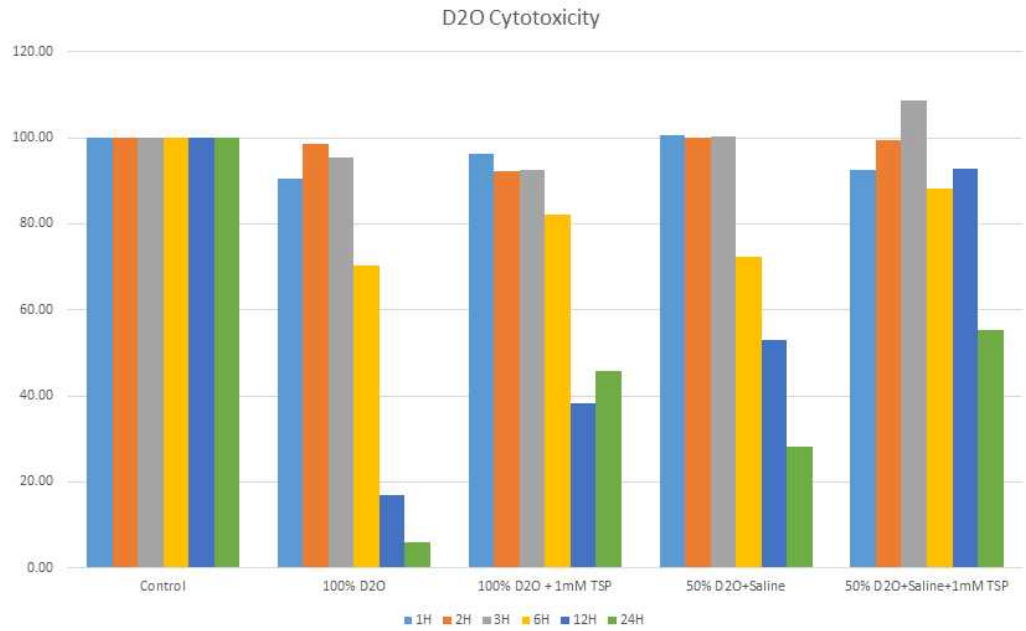
2) 연구 결과

- 본 연구진의 선행연구로 NMR 기준 물질인 TSP의 세포 독성은 확인하였으며, 세포의 NMR 측정 시 사용될 D_2O 농도를 최적화하였음
  - 이와 더불어 NMR 측정 시 사용되는 D_2O의 노출 시간에 따른 세포 독성을 확인하고, TSP와 동시에 사용하였을 시의 독성 또한 평가
  - TSP의 농도는 1mM로 고정하고, D_2O의 농도와 노출 시간을 변수로 하여 rMSC의 생존률 변화 관찰
- 줄기세포 D_2O 노출에 따른 세포 생존률 결과
  - 줄기세포를 D_2O에 노출시킨 후 MTT assay로 세포 생존률을 확인하였음 (그림 47)
    - D_2O 노출 시간에 따른 세포 생존률을 확인 하였을 때, 50% D_2O 군에서 3시간 노출까지는 대조군과 비교하여 세포 생존율의 차이가 미미한 것을 확인하였으며, 1mM TSP를 첨가한 그룹의 경우 3시간 노

국가연구개발 보고서원문 성과물 전담기관인 한국과학기술정보연구원에서 가공·서비스 하는 연구보고서는 동의 없이 상업적 및 기타 영리목적으로 사용할 수 없습니다

출에서 대조군보다 더 증식한 것을 확인할 수 있었음

- 100% D_2O 그룹의 경우 노출 시간이 길어질수록 대조군 대비 세포 생존률이 유의하게 저하됨.
- 이 결과, NMR 측정 시 D_2O에 대한 노출 시간은 50% D_2O saline의 경우 3시간 이하로 이루어져야 세포 생존율에 영향을 미치지 않는다는 것을 확인함



< 그림 47. D_2O 세포 독성 측정 결과 >

3) 결론 및 고찰

- 세포 시료의 NMR 측정 시 사용될 D_2O 농도와 노출 시간을 최적화하였음
  - 50% D_2O 용액에서 3시간 이내 NMR 측정을 시행한다면, 세포 생존율의 차이 없이 연속적인 NMR 측정이 가능할 것으로 사료됨 (세포 독성 미미함)
  - 이 결과는 3차원 배양세포에만 적용한 결과로서 펠렛 상태의 세포에 적용 시 나타나는 세포 독성은 확인하지 않음
- 차후에는 농도 범위를 좀 더 세분화하여 D_2O의 Locking 최소 농도를 확인하고, 다른 용매에서의 세포 독성 또한 확인할 계획임

국가연구개발 보고서원문 성과물 전담기관인 한국과학기술정보연구원에서 가공·서비스 하는 연구보고서는 동의 없이 상업적 및 기타 영리목적으로 사용할 수 없습니다

다. 3차년도

3차년도 목표	3차원 배양세포의 PEMF 자극 조건의 최적화를 도모하고 MRS 및 NMR을 이용한 세포 물질대사 측정법 확립

■ 최적화된 펄스형 전자기장 자극이 지방세포 및 조직에 미치는 영향 확인: 세포 물질대사 측정

■ 지방 분화 세포의 3차원 배양 시 최적의 펄스형 전자기장 자극 조건 확립
■ 최적화된 자극 방법에 의한 세포 및 조직의 대사물질 정량 분석: 자기공명분광법 시행
■ 지방 세포 및 조직의 자극 방법 및 정량 분석법 프로토콜화

■ 펄스형 자기자극 (PEMF) 장치의 시스템 및 코일 최적화
  ▫ 기존 회로에서의 스위칭 다이오드 소자 변경으로 동작의 안정화를 꿰함
  ▫ 코일의 발열에 의한 자극을 최소화 하기 위해 코일 하우징 및 쿨링 시스템 도입
■ 펄스형 자기자극 (PEMF) 장치의 세포자극 신뢰성 확보 및 검증
  ▫ 세포: hMSC (골수유래 줄기세포)
    - 지방분화배지를 이용한 지방분화 시 PEMF 자극을 주어 지방분화 억제 효과 확인
  ▫ PEMF 자극 프로토콜
    - 1차:자극 주파수 1Hz / 10㎐, 자기장 세기 : 300/500/700 ㎜T, 자극시간: 10 / 60분, 자극 기간: 16일
    - 2차: 자극 주파수 10㎐, 자기장 세기 : 300/500/700 ㎜T, 자극시간: 10 / 60분, 자극 기간: 16일
  ▫ 자극 프로토콜의 변수 중 10분 자극과 10Hz에서 줄기세포의 지방분화 억제 효과가 유의미한 것으로 확인함
■ 최적화된 자극 방법에 의한 세포 및 조직의 대사물질 정량 분석: 자기공명분광법 시행
  ▫ 지방전구세포의 지방 분화 시 PEMF 자극의 효과를 NMR 측정을 통하여 확인
  ▫ NMR 스펙트럼을 이용한 대사물질 정량화 결과 또한 골수유래 줄기세포의 지방 분화 억제 경향과 마찬가지로 자극 프로토콜의 변수 중 10분 자극과 10Hz에서 줄기세포의 지방분화 억제 효과가 유의미한 것으로 확인함

(1) PEMF 시스템 및 코일 최적화

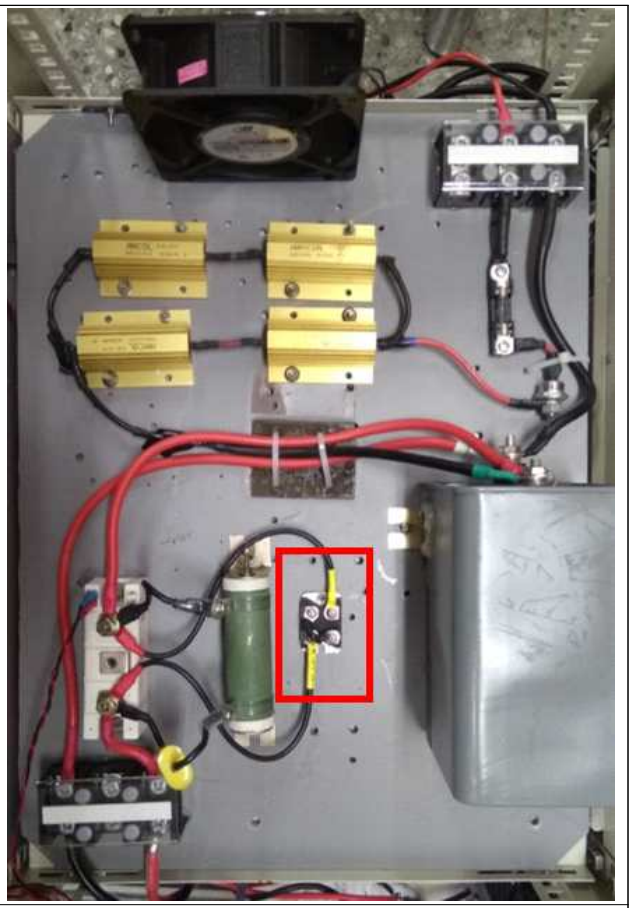
■ 1, 2차년도 실험을 진행하면서 나타난 개선사항을 반영하여 회로 및 코일 수정

1) 회로 수정 및 최적화

- 기존 회로에서 전류를 코일로 흘려 보내는 gate소자 보호를 위해 다수의 고가 다이오드를 직렬로 연결하여 사용함
- 비용적 측면에서 낭비이며 스파이크와 같은 불안정한 동작이 관찰됨
- 스위칭 특성이 우수한 다이오드로 대체하여 gate 부분 보호 회로를 수정함
- 아래의 사진 (그림 48)에서 붉은색 박스로 표기되어 있는 부분이 게이트 보호 다이오드로 회로가 수정된 부분임

국가연구개발 보고서원문 성과물 전담기관인 한국과학기술정보연구원에서 가공·서비스 하는 연구보고서는 동의 없이 상업적 및 기타 영리목적으로 사용할 수 없습니다

기존 회로의 gate 보호 다이오드 부분



수정된 회로의 gate 보호 다이오드 부분

< 그림 48.최적화 및 안정성을 위해 수정한 다이오드 부분 >

2) 세포 자극 프로브 코일 쿨링 및 하우징

- 기존의 세포 자극 프로브 코일은 강한 전류가 흐름에 따라 진동과 많은 열이 발생하였음
- 코일의 열은 외부의 팬(fan)으로부터 발생된 바람을 통해 쿨링함
- 코일의 진동 부분은 코일 아래에 스펀지를 통한 진동 감소와 지지대와 클램프를 사용하여 코일로부터 세포가 있는 플레이트에 진동이 전달되지 않게 함
- 이 방식은 자극 장치 주변에 많은 부품들이 번거롭게 설치되어 있어 위치를 이동했을 때 재설치를 해야 함
- 이러한 문제를 해결하기 위해 열에 의한 변형이 없고, 쿨링을 위한 팬(fan)을 내부에 포함하며, 바람이 잘 빠져나갈 수 있는 케이스를 제작하여 코일 프로브 부분을 하우징함
- 또한 세포 시료가 위치할 4 well plate를 쉽게 장치할 수 있는 플레이트를 제작함
- 이 케이스와 플레이트가 닿지 않게 하였고, 각 케이스와 플레이트 아래에 진동 방지 패드를 추가로 설치하여 진동이 전달되지 않게 함

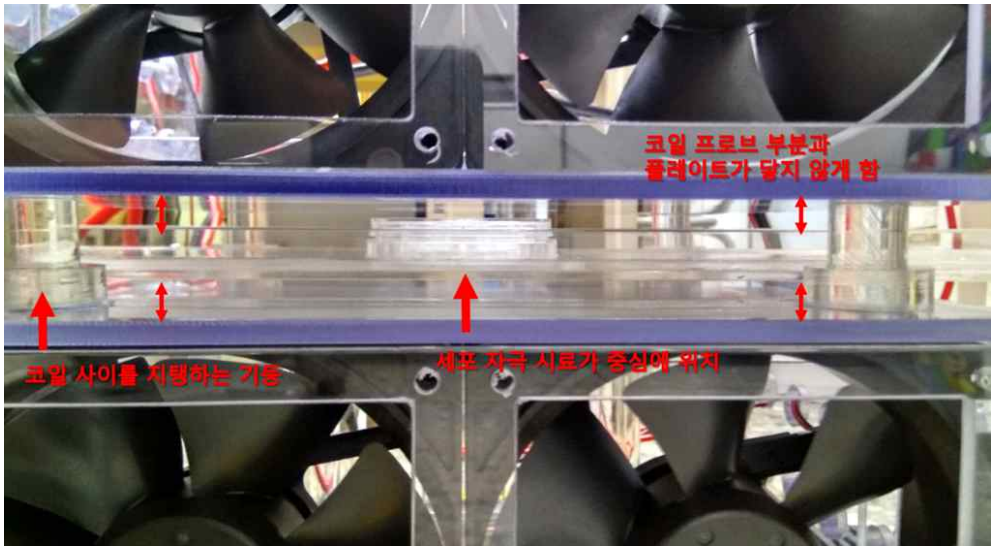
국가연구개발 보고서원문 성과물 전담기관인 한국과학기술정보연구원에서 가공·서비스 하는 연구보고서는 동의 없이 상업적 및 기타 영리목적으로 사용할 수 없습니다

수정 전 세포 자극 코일 프로브

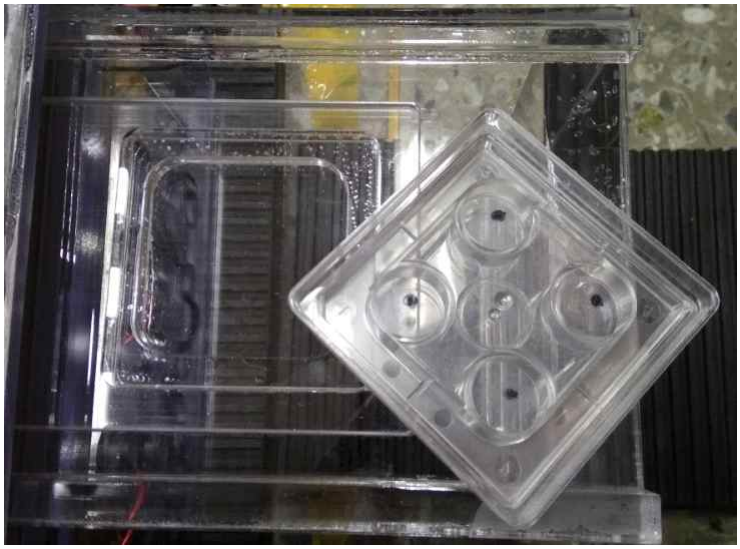
수정 후 세포 자극 코일 부분

< 그림 49. 수정 전, 후의 세포 자극 장치의 전체 모습 >

국가연구개발 보고서원문 성과물 전담기관인 한국과학기술정보연구원에서 가공·서비스 하는 연구보고서는 동의 없이 상업적 및 기타 영리목적으로 사용할 수 없습니다



< 그림 50. 수정된 세포 자극 장치의 코일 세부 모습 >



< 그림 51. 4 well plate가 쉽게 배치 될 수 있게 세포 시료 플레이트에 홈을 설계 >

(2) 지방분화 줄기세포에의 PEMF 자극 적용

■ hMSC를 이용한 지방분화 실험에 PEMF를 자극하여 지방 억제 관찰
■ 제작한 PEMF 시스템의 지방분화 유효성 검증

1) 연구 방법

- 개발된 자기장 발생 장치를 이용하여 자극 프로토콜에 따른 지방분화 줄기세포의 변화를 관찰
  - 자기장의 세기, 자극시간을 변수로 하여 지방세포의 변화 관찰
- 줄기세포:hMSC (human Mesenchymal Stem Cells)
  - hMSC (hMSCs, PT-2501, Lonza, Walkersville, MD, USA)

국가연구개발 보고서원문 성과물 전담기관인 한국과학기술정보연구원에서 가공·서비스 하는 연구보고서는 동의 없이 상업적 및 기타 영리목적으로 사용할 수 없습니다

- ▫ 파종농도: $1x10^4$/well,(4well plate)
- ▫ 기본배지: Dulbecco's Modified Eagle's Medium-Low glucose (DMEM-LG; Gibco, USA)

▪ 지방 분화 : 지방분화배지는 3일, 지방유지배지는 1일의 간격으로 번갈아 교체하며 지방분화를 유도함(표 10, 표 11; 2차년도와 동일)

- ▫ 1사이클 = 지방분화 배지 3일 + 지방유지 배지 1일 = 4일

▪ 지방분화 줄기세포의 자극을 위한 자극 프로토콜

- ▫ 1차 실험
- - 자극 프로토콜
  - ✓ 자극 주파수 1Hz / 10Hz, 자기장 세기 : 300/500/700 mT, 자극시간: 10 / 60분
- - 지방분화 유도배지의 교환주기에 맞추어 총 16일간 자기장 자극을 가한 후 7일간의 배양안정화를 거쳐 지방분화 억제율의 변화를 관찰
- ▫ 2차 실험
- - 자극 프로토콜
  - ✓ 자극 주파수: 10Hz, 자기장 세기 : 300/500/700 mT, 자극시간: 10 / 60분
- - 두 번째 실험에서는 7일간의 안정기를 주지 않고 총 16일간의 자기장 자극을 인가한 후 관찰

▪ Oil Red O 염색을 통한 생화학적 검증

- ▫ 염색을 통하여 hMSCs의 지방 분화 과정을 형태학적으로 관찰함
- ▫ 염색 방법 서술

㉠ PBS로 시편을 세척함

㉡ Formalin 용액으로 1시간 시편 고정

㉢ 증류수로 세척 후, isopropanol 용액으로 5분간 반응 후 드라이기를 이용하여 시편 건조

㉣ Oil Red O 용액으로 30분간 염색 후 증류수로 4번 세척한 후 현미경으로 관찰

▪ 통계학적 검증

- ▫ Statistical Package for Social Science Software (SPSS version 22, Chicago, IL, USA)로 분석
- ▫ ANOVA, Bonferroni’s post hoc test, Independent T-test 이용

2) 연구 결과

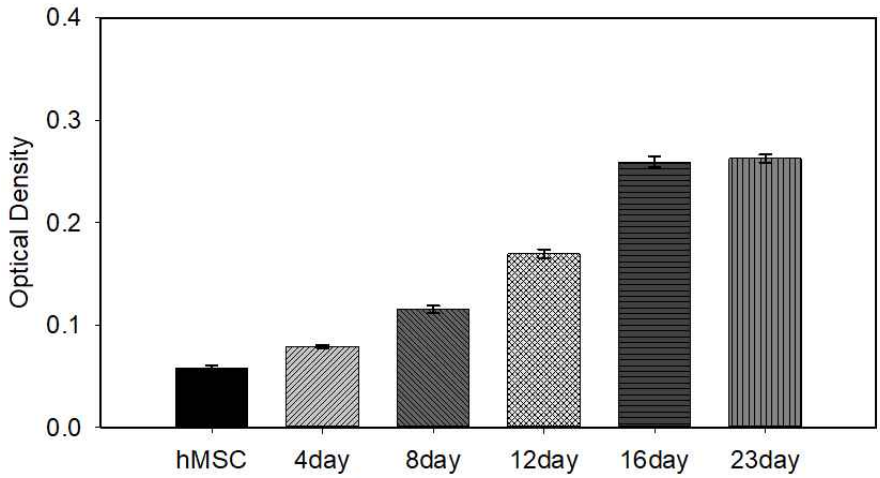
▪ 1차 실험

- ▫ 16일간의 PEMF 자극 후 8일간의 안정기를 거친 hMSC의 지방분화율을 확인
- ▫ 대조군의 지방분화 확인 및 시간이 지남에 따른 지방분화 진행 정도 확인 (표 14, 그림 52)

< 표 14. Oil-red-O 염색을 통한 지방분화줄기세포 대조군의 지방분화율 정량화>

Group	N	Average	SD
hMSC	4	0.058	0.007
4day	4	0.079	0.003
8day	4	0.115	0.007
12day	4	0.170	0.008
16day	4	0.259	0.011
24day	8	0.263	0.011

국가연구개발 보고서원문 성과물 전담기관인 한국과학기술정보연구원에서 가공·서비스 하는 연구보고서는 동의 없이 상업적 및 기타 영리목적으로 사용할 수 없습니다



< 그림 52. Oil-red-O 염색을 통한 지방분화 기간에 따른 지방분화율의 변화 추이 >

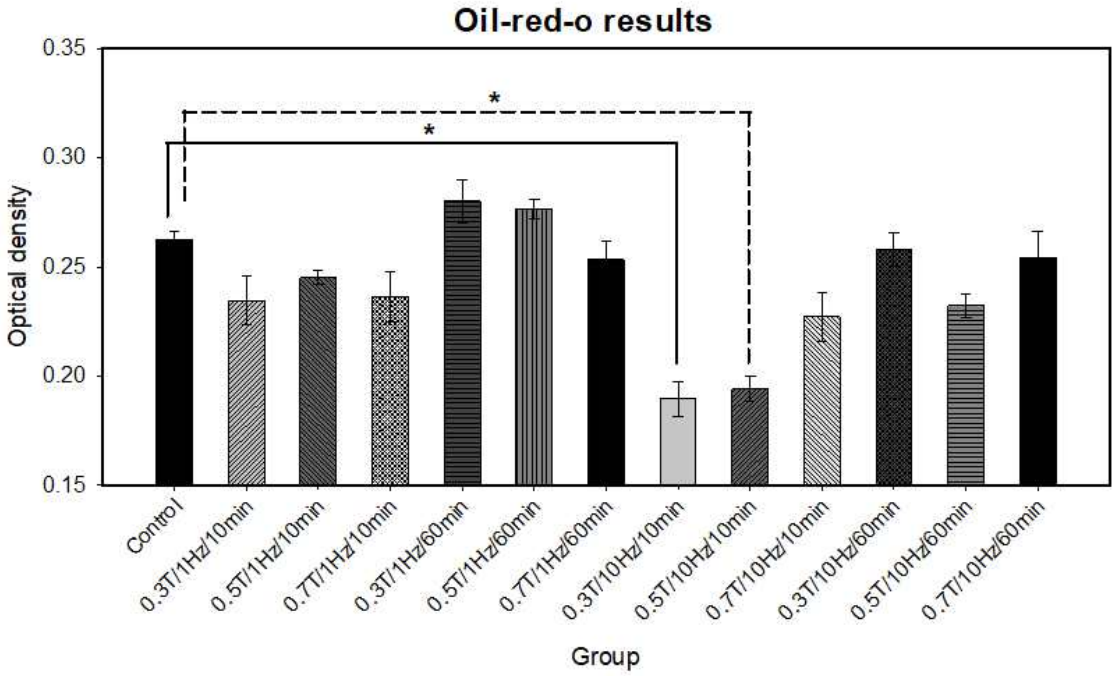
- 지방분화에서 PEMF 자극의 최적화된 프로토콜을 도출하기 위하여 자기장 자극의 세기, 주파수, 자극시간의 변수 중 주된 영향을 주는 인자를 실험으로 확인
- 대부분 PEMF 자극을 받은 그룹은 자극을 받지 않은 그룹에 비해 지방화가 감소하는 경향
- 0.3 T / 10 Hz / 10 min와 0.5 T / 10 Hz / 10 min 그룹에서 대조군과 비교하여 지방분화율이 유의하게 감소하는 경향이 나타남 (표 15, 그림 53)

< 표 15. Oil-red-O 염색을 통한 대조군과 PEMF 자극군간의 정량화된 지방분화율 비교 >

Group	N	Aveage	SD	*P-value*
Control	8	0.263	0.011	
0.3T/1Hz/10min	4	0.235	0.022	0.656
0.5T/1Hz/10min	4	0.245	0.006	1.000
0.7T/1Hz/10min	4	0.236	0.023	0.987
0.3T/1Hz/60min	4	0.280	0.020	1.000
0.5T/1Hz/60min	4	0.277	0.009	1.000
0.7T/1Hz/60min	4	0.253	0.018	1.000
0.3T/10Hz/10min	4	0.190	0.016	***0.000****
0.5T/10Hz/10min	4	0.194	0.012	***0.000****
0.7T/10Hz/10min	4	0.227	0.022	0.072
0.3T/10Hz/60min	4	0.258	0.015	1.000
0.5T/10Hz/60min	4	0.232	0.011	0.324
0.7T/10Hz/60min	4	0.254	0.025	1.000

*ANOVA,*P<0.05, Bonferroni Post hoc*

국가연구개발 보고서원문 성과물 전담기관인 한국과학기술정보연구원에서 가공·서비스 하는 연구보고서는 동의 없이 상업적 및 기타 영리목적으로 사용할 수 없습니다

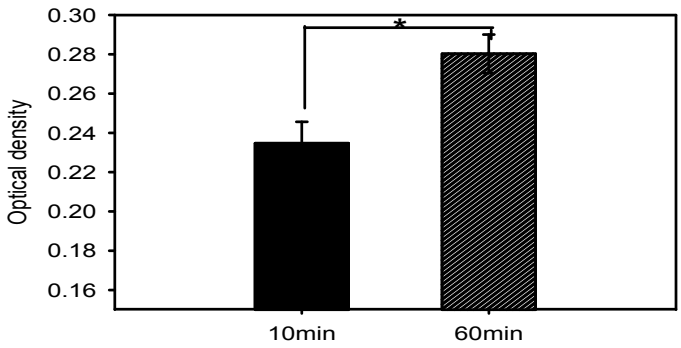


< 그림 53. Oil-red-O 염색을 통한 대조군과 PEMF 자극군간의 지방분화율 비교 그래프 (ANOVA,*P<0.05, Bonferroni Post hoc) >

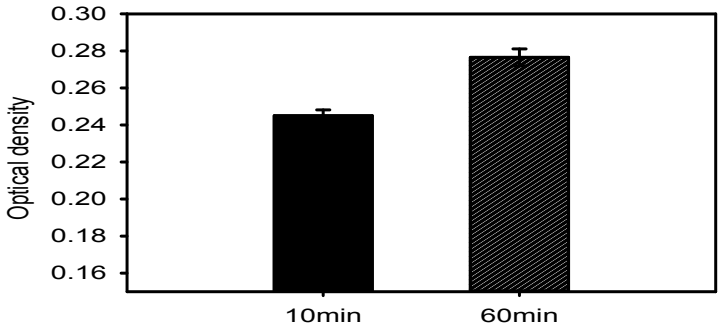
- PEMF 자극 프로토콜 중 시간 변수의 hMSC의 지방분화에 대한 영향을 관찰
- 주파수와 자기장세기가 같은 그룹에서 짧은 자극 시간이 긴 자극 시간에 비해 더 지방분화를 억제시키는 것으로 나타남 (그림 53)
- PEMF 매개변수 중 지방분화에 더 영향을 주는 인자를 확인하기 위해 자기장 자극그룹을 주파수 (표 16, 그림 55), 자극 시간 (표 17, 그림 56, 자기장의 세기 (표 18, 그림 54)로 나누어 확인
- 자기장 자극 주파수에 따른 지방분화 억제의 결과 대조군과 비교하여 10 Hz에서 유의한 차이를 보임
- 자극 시간에 따른 줄기세포의 지방분화 영향에 대한 비교에서는 10분 자극이 대조군과 60분 자극에 비해 유의한 차이가 있음을 확인할 수 있음
- 자기장 세기로 비교하였을 때는 유의한 차이는 나타나지 않음
- 각 매개변수에 대한 지방분화에 대한 영향은 자극을 받은 그룹이 대조군에 비해 감소하는 양상을 보임

- 유의한 차이를 보이는 10 Hz / 10 min의 두 매개 변수의 자극이 지방분화 억제에 유효한 영향을 주고 있음을 확인 (표 16, 그림 54)

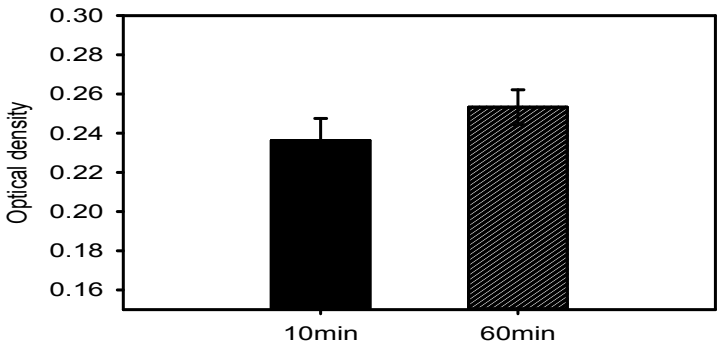
국가연구개발 보고서원문 성과물 전담기관인 한국과학기술정보연구원에서 가공·서비스 하는 연구보고서는 동의 없이 상업적 및 기타 영리목적으로 사용할 수 없습니다



(a) 0.3 T / 1 Hz



(b) 0.5 T / 1 Hz



(c) 0.7 T / 1 Hz

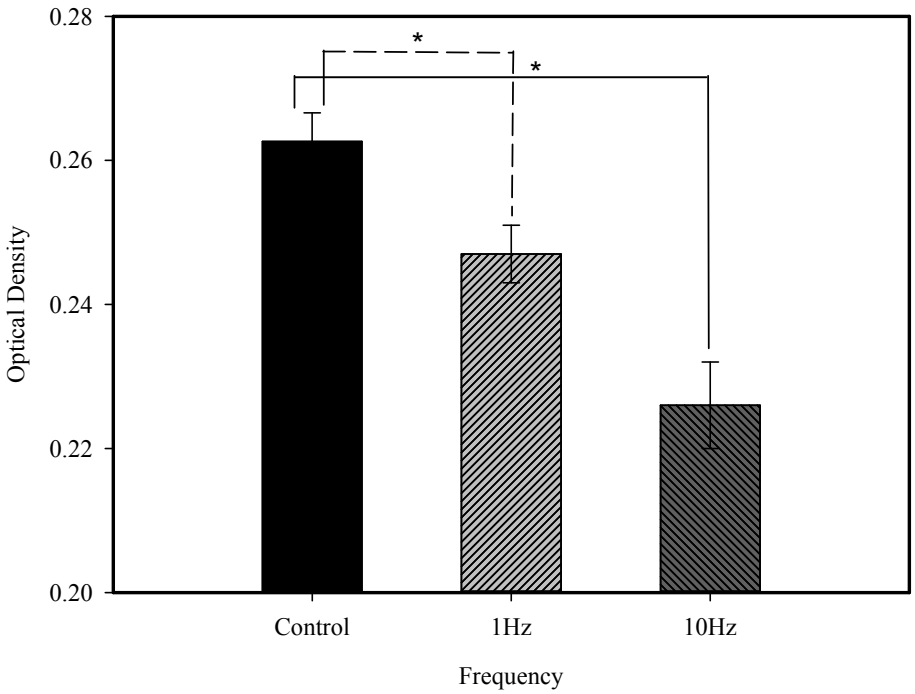
< 그림 54. 시간 변수에 의한 지방분화의 Oil-red-O staining 결과: 10 min and 60 min. (ANOVA, *P<0.05, Bonferroni post hoc) >

국가연구개발 보고서원문 성과물 전담기관인 한국과학기술정보연구원에서 가공·서비스 하는 연구보고서는 동의 없이 상업적 및 기타 영리목적으로 사용할 수 없습니다

< 표 16. Oil-red-O 염색을 통한 주파수에 따른 PEMF 자극군과 대조군간의 정량화된 지방분화율 비교 >

Group	N	Average	SD	P-value
Control	8	0.263	0.011	0.003* (vs. 10 Hz)
1 Hz	32	0.247	0.025	0.011* (vs. 10 Hz)
10 Hz	24	0.226	0.031	0.003* (vs. Control) 0.011* (vs. 1 Hz)

*ANOVA,*P<0.05, Bonferroni Post hoc*



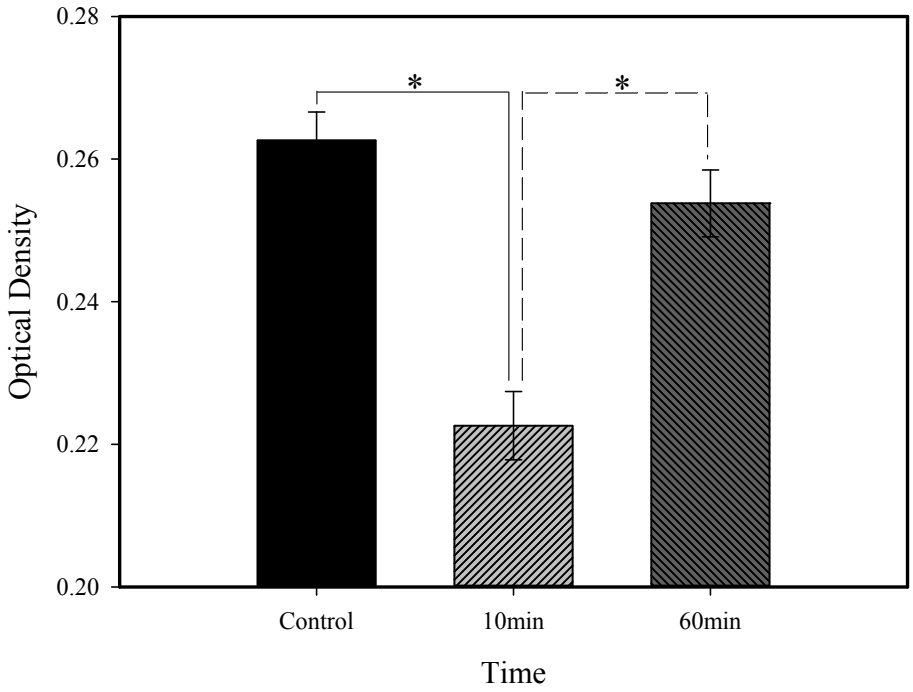
< 그림 55. Oil-red-O 염색을 통한 주파수에 따른 PEMF 자극군과 대조군간의 지방분화율 비교 그래프 (ANOVA,*P<0.05, Bonferroni Post hoc) >

국가연구개발 보고서원문 성과물 전담기관인 한국과학기술정보연구원에서 가공·서비스 하는 연구보고서는 동의 없이 상업적 및 기타 영리목적으로 사용할 수 없습니다

< 표 17. Oil-red-O 염색을 통한 자극 시간에 따른 PEMF 자극군과 대조군간의 정량화된 지방분화율 비교 >

Group	N	Average	SD	*P-value*
Control	8	0.263	0.011	*0.000* (vs. 10 min)*
10 min	28	0.223	0.025	*0.000* (vs. control, 60 min)*
60 min	28	0.254	0.025	*0.000* (vs. 10 min)*

ANOVA,*P<0.05, Bonferroni Post hoc



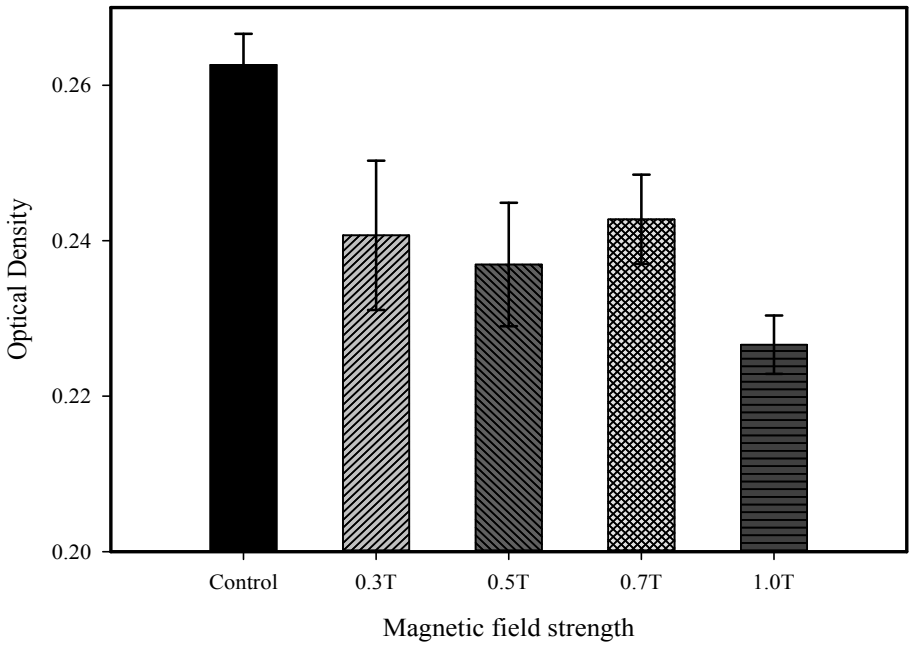
< 그림 56. Oil-red-O 염색을 통한 자극 시간에 따른 PEMF 자극군과 대조군간의 지방분화율 비교 그래프 (ANOVA,*P<0.05, Bonferroni Post hoc) >

국가연구개발 보고서원문 성과물 전담기관인 한국과학기술정보연구원에서 가공·서비스 하는 연구보고서는 동의 없이 상업적 및 기타 영리목적으로 사용할 수 없습니다

< 표 18. Oil-red-O 염색을 통한 자기장 세기 변화에 따른 PEMF 자극군과 대조군간의 정량화된 지방분화율 비교 >

Group	N	Average	SD	*P-value*
Control	8	0.263	0.011	
0.3 T	16	0.241	0.038	0.772
0.5 T	16	0.237	0.032	0.395
0.7 T	16	0.243	0.023	1.000
1.0 T	8	0.227	0.011	0.132

ANOVA,*P<0.05, Bonferroni Post hoc



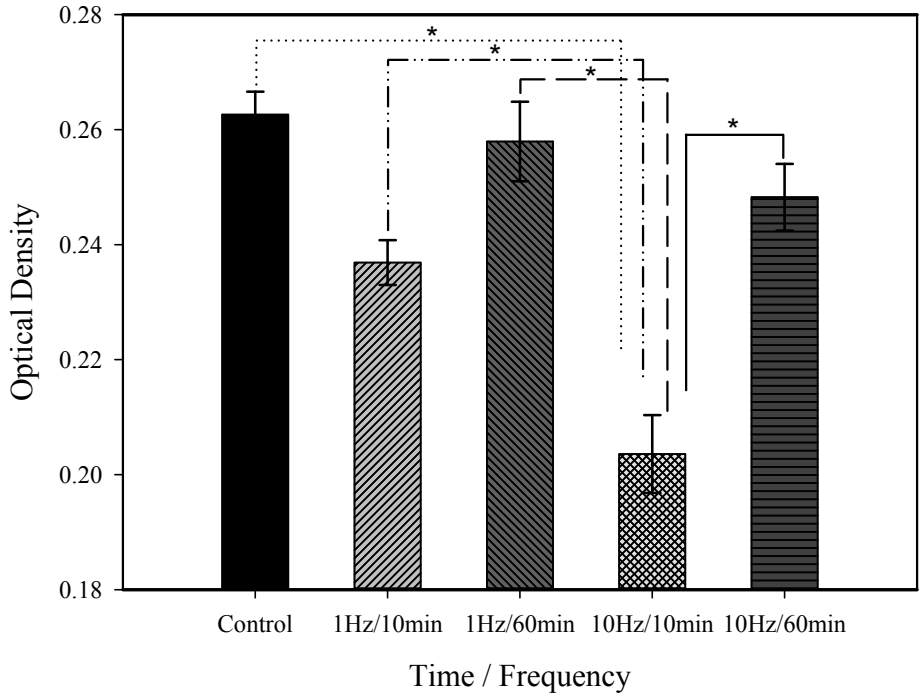
< 그림 57. 자기장 세기 변화에 따른 PEMF 자극군과 대조군간의 비교 (ANOVA,*P<0.05, Bonferroni Post hoc) >

국가연구개발 보고서원문 성과물 전담기관인 한국과학기술정보연구원에서 가공·서비스 하는 연구보고서는 동의 없이 상업적 및 기타 영리목적으로 사용할 수 없습니다

< 표 19. Oil-red-O 염색을 통한 자극 시간과 주파수에 따른 PEMF 자극군과 대조군간의 정량화된 지방분화율 비교 >

Group	N	Average	SD	P-value
Control	8	0.263	0.011	**0.000*(vs. 10Hz/10min)**
1Hz/10min	16	0.237	0.016	**0.001*(vs. 10Hz/10min)**
1Hz/60min	16	0.258	0.028	**0.000*(vs. 10Hz/10min)**
10Hz/10min	12	0.204	0.023	**0.000*(vs. all group))**
10Hz/60min	12	0.248	0.020	**0.000*(vs. 10Hz/10min)**

ANOVA,*P<0.05, Bonferroni Post hoc



< 그림 58. Oil-red-O 염색을 통한 자극 시간과 주파수에 따른 PEMF 자극군과 대조군간의 정량화된 지방분화율 비교 그래프 (ANOVA,*P<0.05, Bonferroni Post hoc) >

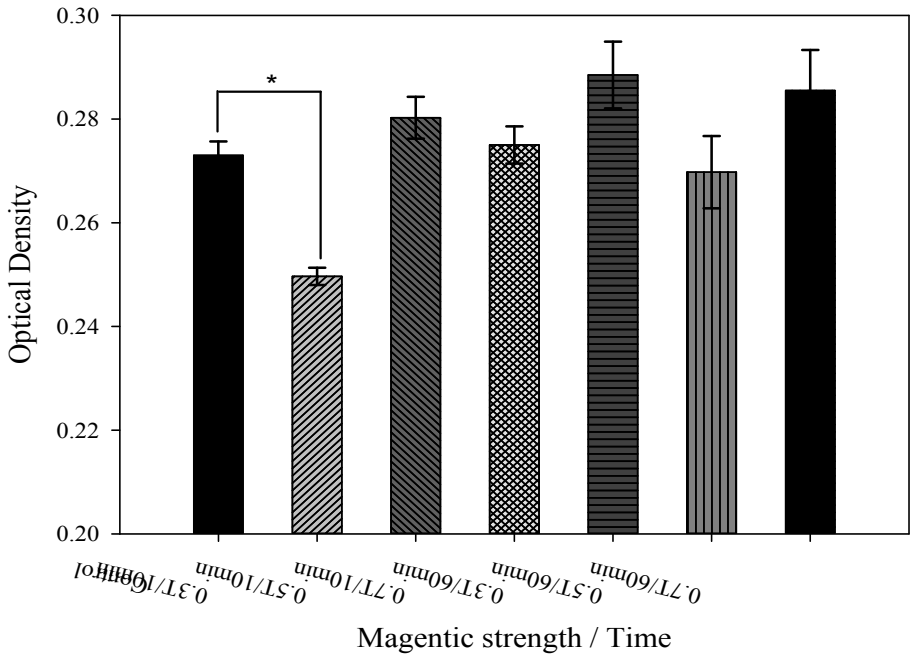
- 2차 실험
  - 1차 실험 결과에서 10분간 PEMF 자극을 받은 그룹은 대조군보다 지방 분화율이 유의하게 감소하는 경향을 보였으나, 60분 자극을 받은 그룹은 대조군과 유의한 차이를 보이지 않음
  - 최적화 된 자기자극 프로토콜을 찾기 위하여 1차 실험에서 유의한 차이를 보인 주파수와 자극시간의 변수 중 자극시간에 대한 변화를 확인하기 위하여 주파수를 10 Hz로 고정한 뒤 실험을 진행함
  - 자기장 자극의 영향을 최대화하기 위해 1차 실험과 달리 세포 자극 후 안정 기간을 두지 않고 16일의 자극 후 Oil-red-O staining을 진행
  - 2차 실험에서는 0.3 T / 10 Hz / 10 min 자극이 대조군과 비교하여 유의한 차이를 나타냄

국가연구개발 보고서원문 성과물 전담기관인 한국과학기술정보연구원에서 가공·서비스 하는 연구보고서는 동의 없이 상업적 및 기타 영리목적으로 사용할 수 없습니다

< 표 20. Oil-red-O 염색을 통한 2차 지방분화실험에서 PEMF 자극군과 대조군간의 정량화된 지방분화율 비교 결과 >

Group	N	Average	SD	*P-value*
Control	4	0.273	0.005	
0.3T/10min	3	0.250	0.003	***0.001****
0.5T/10min	4	0.280	0.008	0.185
0.7T/10min	4	0.275	0.007	0.670
0.3T/60min	4	0.289	0.013	0.068
0.5T/60min	4	0.270	0.014	0.679
0.7T/60min	4	0.286	0.016	0.182

*Independent T-test,*P<0.05*



< 그림 59. Oil-red-O 염색을 통한 자극 시간과 자기장 세기에 따른 PEMF 자극군과 대조군간의 지방분화율 비교 그래프 (Independent T-test,*P<0.05) >

3) 결론 및 고찰 (표 20, 그림 59)

- 이전 연골세포 증식과 지방분화 억제 실험 모두에서 주파수와 자기장강도가 같은 자극에서 자극시간 변수에 의해 결과가 달라짐을 확인함
- 특히 지방분화 억제 실험에서는 10분 자극이었을 때는 대부분 지방분화가 억제되었는데 비해 60분 자극에서는 그 효과가 상실되는 경향을 보임
- 이는 자극 시간에 따른 세포반응이 달라짐을 나타내며 PEMF 자극 시 자극 시간이 중요한 매개변수임을 나타냄

국가연구개발 보고서원문 성과물 전담기관인 한국과학기술정보연구원에서 가공·서비스 하는 연구보고서는 동의 없이 상업적 및 기타 영리목적으로 사용할 수 없습니다

▪ 지방분화 억제와 연골세포 증식의 두 실험에서 유효한 영향을 주는 주파수는 10 ㎐로 나타났고 PEMF 자극은 매개변수를 어떻게 조합하는지에 따라 분화의 억제, 세포의 증식에 각각 적용할 수 있을 것으로 사료됨

(3) MRS 및 NMR을 이용한 세포의 대사 분광 분석

■ 자기공명분광 및 핵자기공명분광을 이용하여 세포 및 조직의 물질대사 변화를 비침습적으로 관찰 가능한 최적화된 분석 프로토콜 확립

■ 정량적으로 측정된 대사물질의 비교를 통한 세포 수준의 지방 억제 효과 분석

1) 연구 방법

① 자기공명분광(MRS)을 이용한 세포의 물질대사 정량 분석법

▪ 임상용 MRS 장치를 이용하여 3D 배양 세포에 별도의 전처리 과정 없이 물질대사를 측정

▪ 세포

▪ MRS 분광 데이터 획득방법

▫ 3D 배양 세포: MG-63 ($5x10^7$cell/ml) in 1% agarose gel

▫ 3T MRI(Philips, Achiva, Netherland)와 호환 가능한 동물용 RF coil(Pulse Teq Limitsed, GU, UK)을 이용함

✓ 준비된 세포는 1.5ml 튜브에 담아서 MRS 측정

▫ 사용된 MR 프로토콜

- Multiplanar gradient recalled acquisition in the steady state(MPGR) 펄스열을 이용하여 Voxel of interest(VOI)를 설정

- Single-Voxel Point Resolved Spectroscopy(PRESS) 펄스열을 이용하여 3D 배양 세포의 분광 신호를 획득

✓ 분광 획득 변수 : TR/TE(Repetition Time/Echo Time) = 4000/37 ms; NSA(Number of Signal Average) = 160; Voxel Size = 5*5*5 mm^3 ; Data Pint = 1024

▪ 기존 오픈소스에 존재하는 분광 분석 프로그램(jMRUI ver5.2, Java-based magnetic resonance user interface, http://www.jmrui.eu/)을 이용하여 세포의 물질대사 신호를 획득

▫ jMRUI에서 제공하는 HLSVD(Hankel Lanczos Squares Singular Values Decomposition) 알고리즘을 이용하여 water peak을 제거한 후 AMARES 알고리즘을 이용하여 분광 peak을 추출하고 정량화함

② 핵자기공명분광(NMR)을 이용한 세포의 물질대사 정량 분석법

▪ 3D 배양 세포의 물질대사 샘플을 반복적·연속적으로 사용하여 시편의 차이에서 오는 오차를 줄임

▪ 3D 배양 지방분화세포

▫ 세포: 3T3-L1 (지방전구세포)

- 파종농도: $1x10^6$/ml의 농도로 약 3㎜ 구형의 1.2(v/v)% alginate bead 제작

- 지방분화배지를 이용하여 3일 분화유도

▪ PEMF를 이용한 3D 배양 지방분화세포 자극 프로토콜

▫ 자극 프로토콜 : 10㎐ (on time: 100 ㎲ off time: 99900 ㎲, 자기장 세기: 300/500/700 ㎜T)

- 자극 조건: 10분/일, 3일간 자극 후 NMR 측정

▪ NMR 분광 데이터 획득방법

▫ 500MHz LC-NMR 기기(11.74T, VNMRS500, Varian, USA)를 사용

국가연구개발 보고서원문 성과물 전담기관인 한국과학기술정보연구원에서 가공·서비스 하는 연구보고서는 동의 없이 상업적 및 기타 영리목적으로 사용할 수 없습니다

- PRESAT 펄스열을 사용: water suppression 가능
  - ✓ 분광 획득 변수 : Saturation delay=1.5초, Relaxation delay=0.02초, 데이터 포인트=32000, 스캔수=512, 스캔 시간=30분 15초

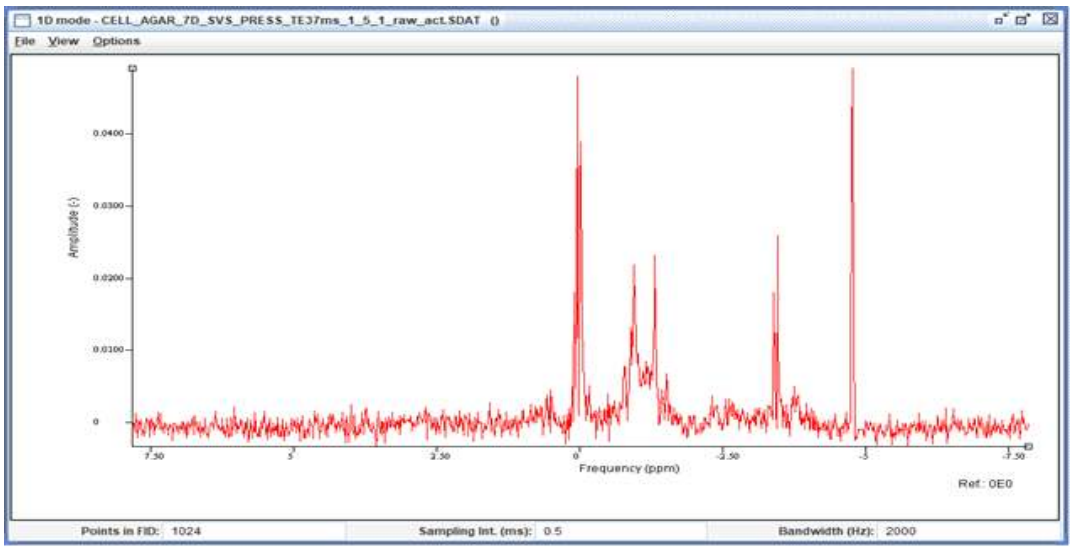
▪ MRS에서 사용된 분광 분석 프로그램(jMRUI ver5.2)과 동일한 알고리즘을 이용하여 세포의 물질대사 peak 신호를 획득하고 정량화함

2) 연구 결과

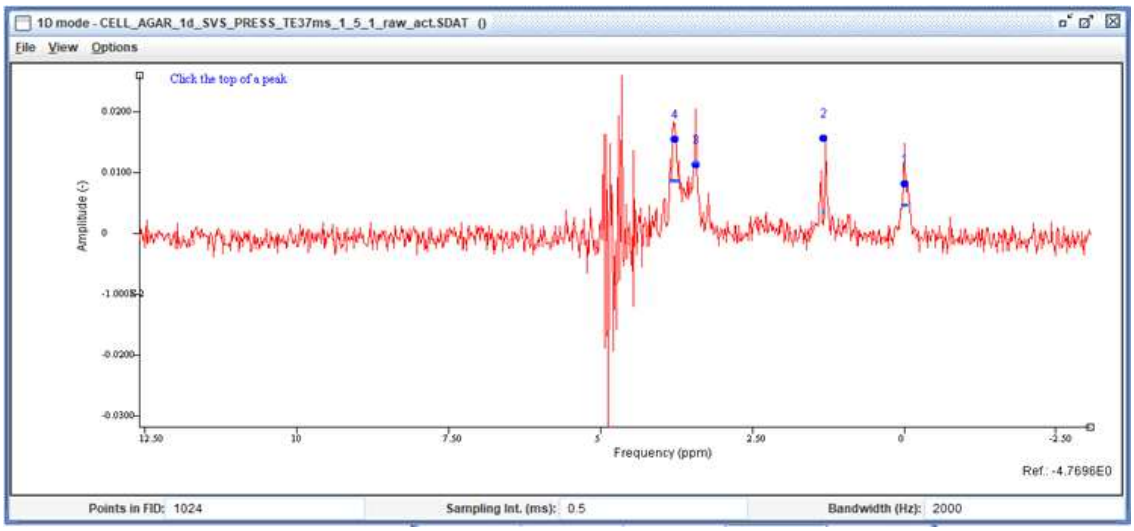
① 자기공명분광(MRS)을 이용한 세포의 물질대사 정량 분석법

▪ 임상용 자기공명영상장치에서 세포 시료를 이용하여 MRS 측정

▫ 획득한 MRS 스펙트럼에서 Lactate와 glucose 피크를 추출하여 정량적인 분석

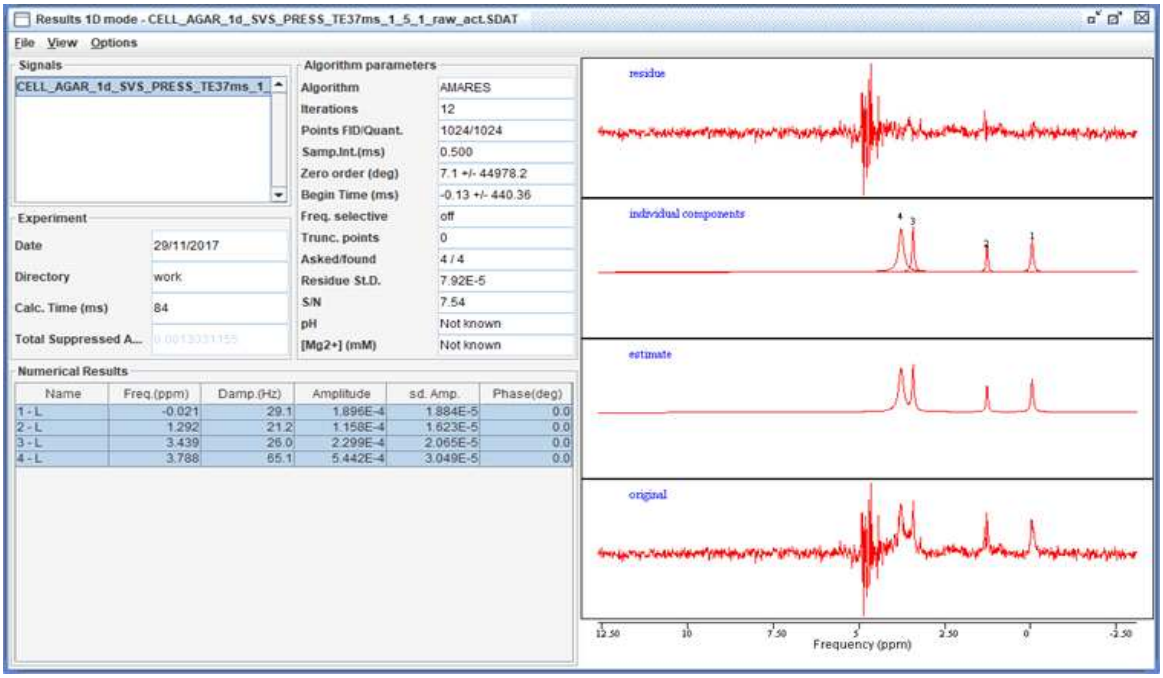


<그림 60. jMRUI에서의 자기공명분광(MRS) 모습>



<그림 61. jMRUI에서의 물질대사 분광모습>

국가연구개발 보고서원문 성과물 전담기관인 한국과학기술정보연구원에서 가공·서비스 하는 연구보고서는 동의 없이 상업적 및 기타 영리목적으로 사용할 수 없습니다



<그림 62. jMRUI에서의 분광 분석 결과 모습>

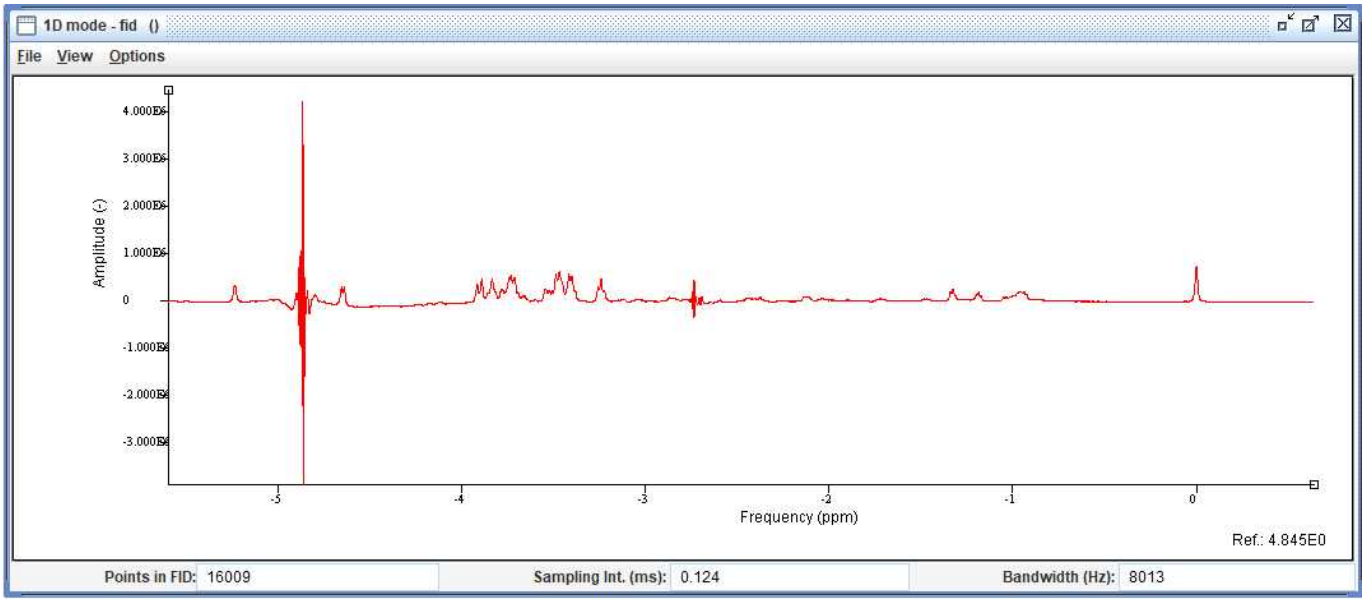
<표 21. 샘플의 물질대사 정량분석 결과>

Metabolite	ppm	Amp (mM)
TSP	-0.000	5
Lactate	1.29	3.05
Glucose 1	3.44	6.06
Glucose 2	3.79	14.35

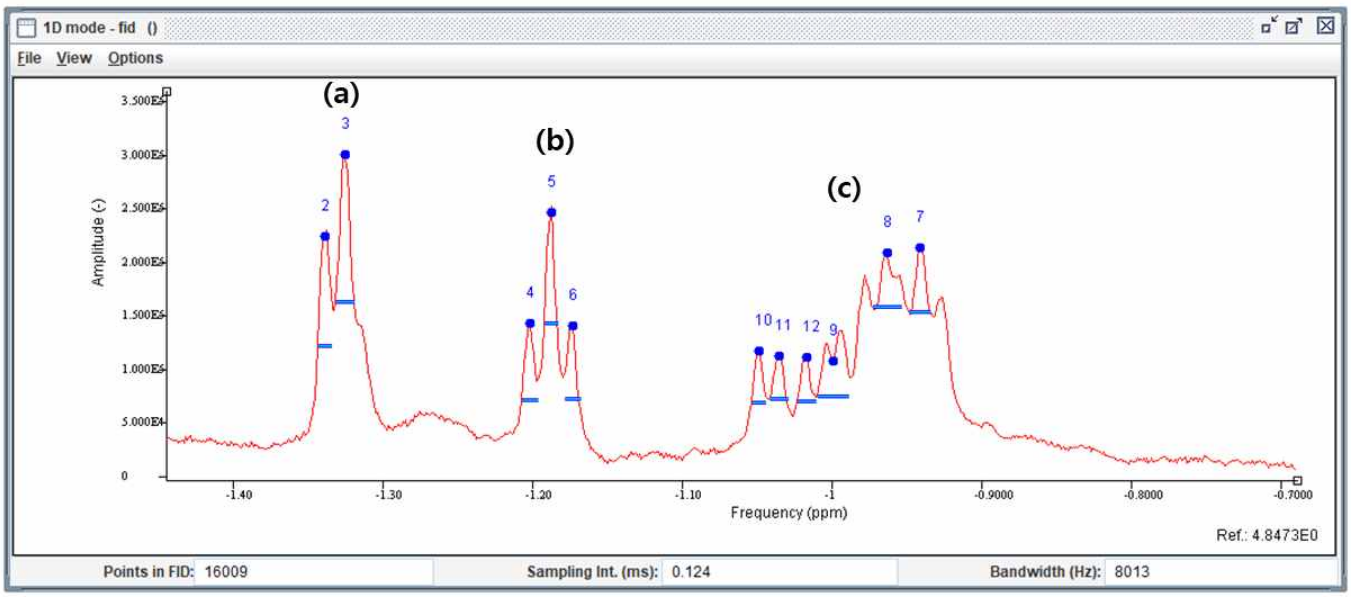
② 핵자기공명분광(NMR)을 이용한 세포의 물질대사 정량 분석법

- 획득한 스펙트럼을 이용한 물질대사 정량을 통한 지방 성분 변화추이를 분석
  - 모든 자극 그룹에서 1.12 ~ 1.90 ppm 범위에 해당하는 지방산량이 대조군 그룹보다 적음
  - 자극 그룹 간 비교에선, 0.3T 그룹에서 모든 종류의 지방산량이 제일 적음
  - 1.32 ~ 1.34 ppm 범위에 해당하는 지방산을 제외한 두 지방산에서는 자극 강도가 약할수록 지방산량이 적음

국가연구개발 보고서원문 성과물 전담기관인 한국과학기술정보연구원에서 가공·서비스 하는 연구보고서는 동의 없이 상업적 및 기타 영리목적으로 사용할 수 없습니다

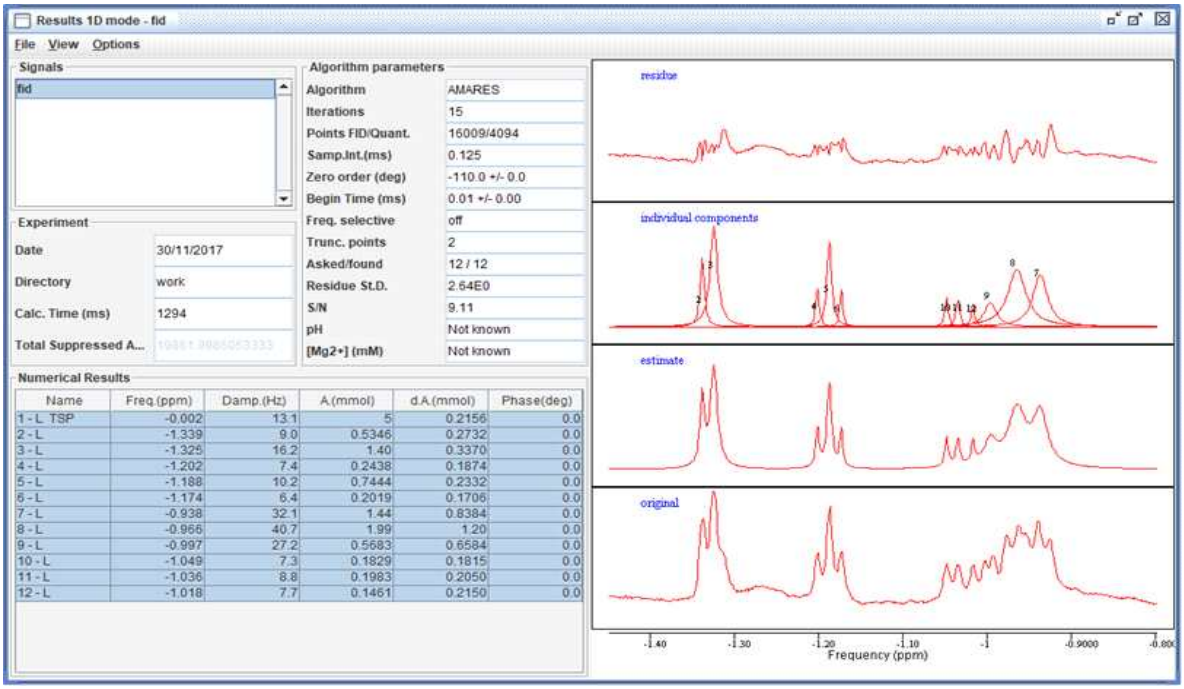


<그림 63. jMRUI에서의 핵자기공명분광(NMR) 모습>



<그림 64. jMRUI에서의 물질대사 분광 모습;(a),(b),(c)는 각기 다른 지방산의 분광을 나타냄>

국가연구개발 보고서원문 성과물 전담기관인 한국과학기술정보연구원에서 가공·서비스 하는 연구보고서는 동의 없이 상업적 및 기타 영리목적으로 사용할 수 없습니다



<그림 65. jMRUI에서의 분광 분석 결과 모습>

<표 22. Control 그룹의 지방산 정량분석 결과>

Control		
Metabolite	Range (ppm)	Amp (mM)
TSP	0.00	5
(a)	-1.32 -1.34	0.88
(b)	-1.12 -1.90	5.09
(c)	-0.96 -1.05	2.88

<표 23. 자극 그룹의 지방산 정량분석 결과>

300mT/10Hz/10min			500mT/10Hz/0min			700mT/10Hz/10min		
Metabolite	Range (ppm)	Amp (mM)	Metabolite	Range (ppm)	Amp (mM)	Metabolite	Range (ppm)	Amp (mM)
TSP	0.00	5	TSP	0.00	5	TSP	0.00	5
(a)	-1.33 -1.34	1.51	(a)	-1.33 -1.34	1.93	(a)	-1.32 -1.33	1.59
(b)	-1.17 -1.20	0.91	(b)	-1.17 -1.20	1.19	(b)	-1.17 -1.20	1.87
(c)	-0.94 -1.04	3.66	(c)	-0.94 -1.05	4.53	(c)	-0.95 -1.04	7.61

국가연구개발 보고서원문 성과물 전담기관인 한국과학기술정보연구원에서 가공·서비스 하는 연구보고서는 동의 없이 상업적 및 기타 영리목적으로 사용할 수 없습니다

3) 결론 및 고찰

- 임상용 MRI 장비를 이용하여 세포에 다른 전처리를 하지 않고 MR 스펙트럼 획득 가능함을 시사 함
  - ✓ 또한, 획득한 MR 스펙트럼으로 각 피크별 물질대사 정량이 가능함을 보임
- Control 보다 PEMF 전자기장 자극을 자극을 받은 세포의 지방산량이 더 적게 측정되어 펄스형 전자기장 자극은 지방세포의 대사활동에 영향을 미치는 것을 확인
- NMR분광 분석 결과가 나타내는 물질대사의 변화추이가 앞서 골수유래 줄기세포를 이용한 지방분화 억제 실험에서 나타난 경향과 동일함을 확인
  - ✓ 0.3T, 0.5T, 0.7T 결과중 0.3T 자극에서 지방량이 좀더 적음을 확인하였으며, NMR 결과 또한 0.3T, 10Hz, 10분 자극에서 지방분화 억제 효과를 보임
- 따라서 핵자기공명분광을 이용하여 세포의 물질대사 변화를 비침습적으로 관찰 가능한 최적화된 분석 프로토콜 제시 가능

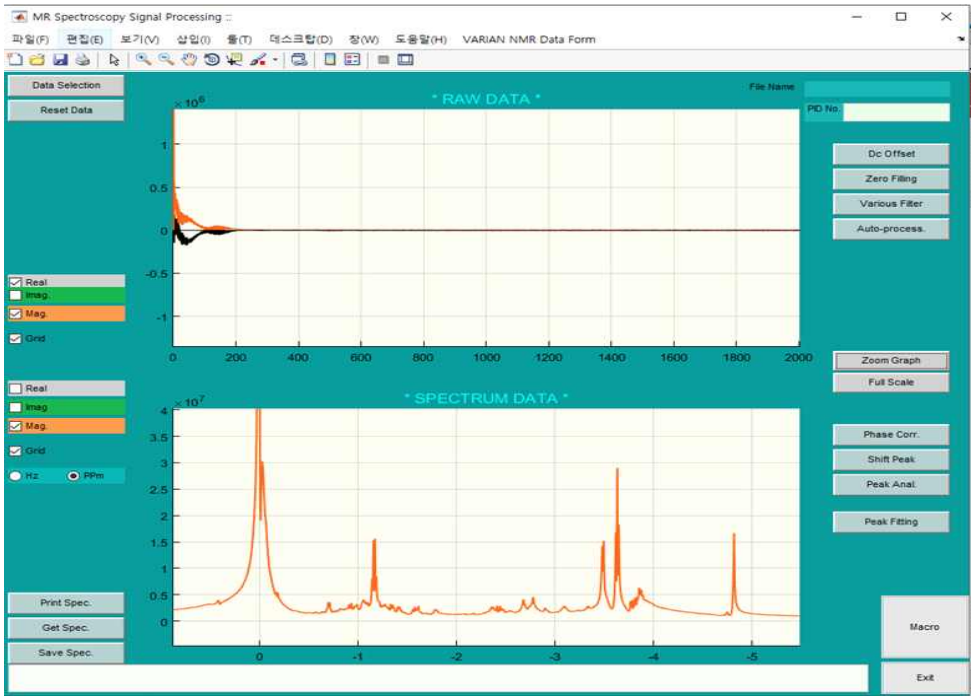
(4) MRS 및 NMR 호환 신호획득 프로그램 제작

■ 자기공명분광 및 핵자기공명분광과 호환되는 분광 분석 프로그램을 제작

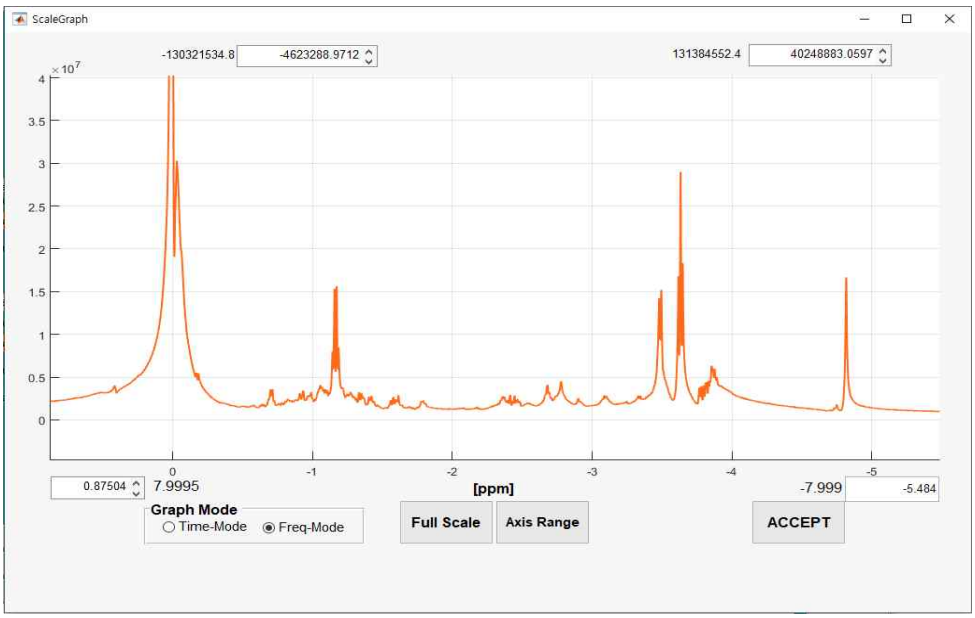
1) 분광 분석 프로그램 제작

- 기존에 존재하는 분광분석 프로그램은 일반적으로 사용되는 MR분광 데이터 포맷에 초점이 맞춰져 있으므로, 본 연구에서 확립한 세포 및 조직의 대사물질 변화를 비침습적으로 관찰하기 위한 최적화된 프로토콜에 적합한 분광 분석 프로그램을 기존에 제작한 MATLAB을 변경하여 제작함 (그림 67-68)
- 하지만, 각 분광분석기 회사에서 사용하는 데이터 포맷은 다 다르고 형식도 복잡할 뿐만 아니라 MRS와 NMR을 동시에 호환되는 분광분석 프로그램 제작에는 다소의 어려움이 존재함
- 본 연구에서 확립한 최적화된 프로토콜에 적합한 데이터 포맷에 따라 raw 데이터를 디스플레이하여 사용자가 원하는 dimension으로 조절하는 시스템은 완성하였으며, 분광분석에 사용되는 여러 파라미터를 이용한 물질대사 peak 검색 및 분석 시스템은 구축을 하였음
- 그림 66은 상부에 시간영역의 MRS raw data를 표시하고 처리할 수 있도록 하였으며 하부 영역은 주파수 영역의 MR 분광을 표시하고 처리할 수 있도록 함. 세포 분화/증식에 따른 정량분석 및 통계처리 기능을 추가함.
- 그림 67은 MR 분광을 정량 분석 후 최종 결과물을 표시하고 저장할 수 있는 창을 보임.

국가연구개발 보고서원문 성과물 전담기관인 한국과학기술정보연구원에서 가공·서비스 하는 연구보고서는 동의 없이 상업적 및 기타 영리목적으로 사용할 수 없습니다



<그림 66. 자체 제작한 MRS 및 NMR 호환 신호획득 프로그램의 전체 모습>



<그림 67. 자체 제작한 프로그램에서의 세포 분광 모습>

(4) 기타 연구: NMR solvent인 D_2O 와 DMSO-d_6의 세포 독성 비교

■ 2차년도 진행한 D20 연구에서 제안한 노출 시간내의 세포 독성을 확인함
■ 이를 바탕으로 대체할 NMR solvent를 선정하여 세포 독성 실험 진행

국가연구개발 보고서원문 성과물 전담기관인 한국과학기술정보연구원에서 가공·서비스 하는 연구보고서는 동의 없이 상업적 및 기타 영리목적으로 사용할 수 없습니다

1) 연구 방법

- 세포 배양
  - 줄기세포: MG-63 (human osteosarcoma cell line)
  - 파종농도: $1x10^4$/well (24-well plate 사용)
  - 기본배지: Dulbecco's Modified Eagle's Medium-High glucose (DMEM-HG; Gibco, USA)
- 실험 그룹
  - 세포 배양 시 배지의 조성을 달리하여 D_2O 와 DMSO-d_6 노출 시간에 따른 세포 독성을 평가
  - 실험군 배양액은 D_2O saline (0.9% NaCl,99.9% Deuterium water)과 DMSO-d_6 saline을 생리식염수 (0.9% NaCl)와 농도별로 희석하여 준비 (표 24)
  - 세포 배양 시 한 well에 들어가는 배지의 양은 1ml로 고정
  - 모든 실험군에는 NMR 정량측정 시 기준 물질로 사용하는 1mM TSP를 첨가함

< 표 24. NMR Locking 용매 실험군 분류: D_2O 와 DMSO-d_6 >

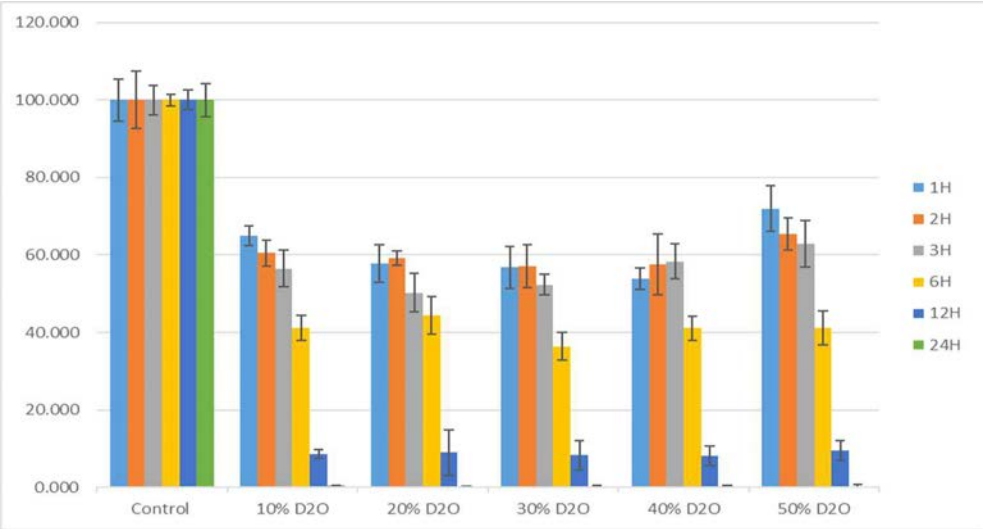
그룹	D_2O 배지 조성	DMSO-d_6 배지 조성
대조군	100% DMEM-HG	
실험군	50% D_2O saline	50% DMSO-d_6 saline
	40% D_2O saline	40% DMSO-d_6 saline
	30% D_2O saline	30% DMSO-d_6 saline
	20% D_2O saline	20% DMSO-d_6 saline
	10% D_2O saline	15% DMSO-d_6 saline
	-	10% DMSO-d_6 saline
	-	5% DMSO-d_6 saline

  - D_2O 노출시간: 1, 2, 3, 6, 12, 24 시간
  - 노출 후 즉시 MTT assay를 시행하여 세포 생존율 측정
- 세포 증식율 및 생존율: MTT assay
  - Cell Proliferation Kit Ⅰ, MTT (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) 사용
  - 연골세포 증식율 측정법과 동일

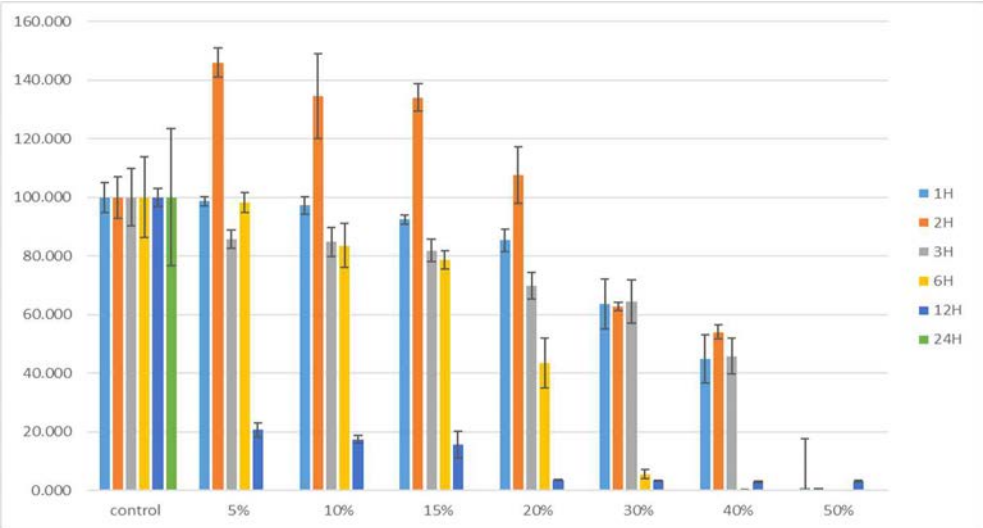
2) 연구 결과

- D_2O 세포 생존율 (그림 68)
  - 대조군에 비하여 모든 농도와 노출시간에서 유의하게 낮은 생존율을 보이는 것을 확인 ($p<0.05$)
- DMSO-D_6 세포 생존율 (그림 69)
  - 농도가 높을수록 세포 생존율이 낮아지는 경향을 보임
  - 5, 10% 그룹의 1, 2시간 노출 조건을 제외하고는 모두 유의한 수준의 세포독성을 확인 ($p<0.05$)
  - 2시간 노출 시간의 경우 DMSO-D6 20% 농도 범위까지 대조군에 비하여 세포가 성장한 것을 확인

국가연구개발 보고서원문 성과물 전담기관인 한국과학기술정보연구원에서 가공·서비스 하는 연구보고서는 동의 없이 상업적 및 기타 영리목적으로 사용할 수 없습니다



< 그림 68. D_2O 농도별, 노출 시간별 생존율 (단위 %) >



<그림 69. $DMSO\text{-}D_6$ 농도별, 노출 시간별 생존율 (단위 %) >

3) 결론 및 고찰

- DMSO-D6 는 10% 농도 내에서 2시간 이내의 노출에는 세포 독성이 통계적으로 무시할 수 있음을 확인
- 본 연구에서 20% 이내 DMSO-D6 와 1 mM TSP 조건에서 NMR 측정을 2시간 이내로 수행한다면, 연속적이고 반복적인 NMR 측정이 가능할 것으로 사료됨

국가연구개발 보고서원문 성과물 전담기관인 한국과학기술정보연구원에서 가공·서비스 하는 연구보고서는 동의 없이 상업적 및 기타 영리목적으로 사용할 수 없습니다

4. 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

1) 연구개발목표의 달성도

연차	연구개발목표	달 성 내 용	달성도(%)
1차년도	세포 및 조직에 적용 가능한 펄스형 전자기장 시스템 개발 및 자극 프로토콜 개발	■ 프로토콜 변경이 가능한 펄스형 전자기장 시스템을 개발 ■ 제작한 PEMF 시스템을 이용한 자극 실험을 통하여 연골세포 성장의 유의미한 결과 확인 ■ 이를 통해 PEMF 자기가극을 이용한 세포 자극 프로토콜 개발의 기틀을 마련	100
2차년도	펄스형 전자기장 시스템을 조직 유사 물질 팬텀 및 지방 분화 세포에 적용하여 자극 프로토콜 확립	■ 다양한 문헌을 조사하여 자극 주기(Hz), 자극 시간(minute), 자기장 강도(Tesla), 자극 횟수(일/주)등의 프로토콜의 요소를 확립함 ■ 이 요소들을 바탕으로 문헌에서 많이 사용된 프로토콜을 변수화하여 지방 분화의 유효성을 확인	100
3차년도	3차원 배양 세포의 PEMF 자극 조건의 최적화 및 MRS/NMR을 이용한 세포 물질대사 측정법 확립	■ 수화겔인 alginic acid와 agarose gel을 이용한 3차원 배양법 확립 ■ 고농도 세포 시료를 이용하여 임상용 MRI 장비에서 세포 MR 스펙트럼 획득 가능성을 보임 ■ 3차원 배양 지방분화세포의 NMR 스펙트럼을 획득하여 지방량의 변화추이를 관찰함	100

2) 관련분야의 기술발전에의 기여도

- 펄스형 전자기장 자극기(PEMF)
  - 본 연구에서 개발한 펄스형 전자기장 자극기는 세포에의 적용 시 자극 변수로 자극 주기(Hz), 자극 시간(minute), 자기장 강도(Tesla)를 선택하여 조절할 수 있음
  - 자극 주기의 경우 on time(10~2500μs)과 off time(10~2500000μs)에 따라 다양한 주파수로 조절할 수 있으며 자극시간은 1분~60분까지, 자기장 강도의 경우 약 300mT~1200mT까지 조절이 가능함
  - 또한 PEMF의 자극 코일 프로브의 경우 4 well plate에 균일한 자장을 발생시킬 수 있도록 설계함
  - 위와 같은 특징을 바탕으로 다양한 세포에 적합한 프로토콜 연구가 진행이 가능함
  - 이러한 연구 진행은 특정 세포에 목적하는 바를 위한 자장 자극 프로토콜을 찾아 의료기기의 개발에 기여할 수 있음
  - 또한 자기장이 여러 세포의 작용 기전에 따라 나타나는 효과에 대한 예비(preliminary)연구에 기여할 수 있음
- 지방 분화 억제 프로토콜 확립
  - 지방 분화 억제 프로토콜 연구에서는 10분 자극, 10Hz에서 지방 분화가 억제되는 것을 통계적 기법을 통해 확인함
  - 위와 같은 변수들을 바탕으로 지방 분화 억제를 기반으로 한 의료기기 개발의 예비 연구에 기여할 수 있음
  - 여기서 사용된 프로토콜은 다양한 문헌 조사를 통하여 진행하였지만, 모든 변수를 포함하는 지방 분화 억제 프로토콜 실험은 미흡한 부분이 있음
  - 하지만 이 연구에서 실험한 프로토콜의 데이터를 기반으로 세부적인 변수를 설정하여 실험한다면 좀 더 유효한 효과를 가지는 지방 분화 억제 프로토콜을 개발할 수 있을 것으로 사료됨

국가연구개발 보고서원문 성과물 전담기관인 한국과학기술정보연구원에서 가공·서비스 하는 연구보고서는 동의 없이 상업적 및 기타 영리목적으로 사용할 수 없습니다

- ▫ 또한 이 연구의 데이터를 기반으로 자기장이 지방 억제에 미치는 기전을 찾는 연구를 진행할 수 있을 것으로 사료됨
- ▫ 위의 두 가능성(세부적인 변수 설정 실험, 지방 억제 기전 실험)은 지방 억제에 대한 자기장 관련 연구에 크게 기여할 수 있을 것으로 예상됨

▪ MRS 및 NMR 기반의 세포물질 대사 측정 기법

- ▫ 고농도의 3차원 배양 세포 시료를 이용하여 임상용 MRI 장비에서도 MR 스펙트럼 획득 가능함을 보임
- ▫ 이는 저자장 MRI 장비에서도 세포시료의 물질대사 분석이 가능함을 시사하며, 차후 분자영상 등에 세포 및 조직을 이용한 대사물질 연구에 응용될 수 있음
- ▫ NMR 기반의 세포물질 대사 측정에서는 locking solvent의 세포 독성을 확인하고, 나타나는 세포 독성을 최소화 시켜 반복적, 연속적으로 NMR 측정하는 법을 구축함

◦ 세부 목표, 달성내용 및 자체평가 결과

번호	세 부 목 표	달성도(%)	달 성 내 용	관련 증빙
1	펄스형 전자기장에 의한 타겟팅 대상 (세포시료)에 따른 자장 분석 모의실험	100	■ 세포 시료의 크기 내(60 mm × 60 mm)에 균일한 자장을 인가하기 위해 3가지 type을 정하고 시뮬레이션 진행 ■ 3가지 각 형태의 시뮬레이션을 통해 코일 type별 권선 수 및 인덕턴스를 설정하고 실제로 제작	특허, 표 1~6
2	전자기장 구동 시스템 전원 및 하드웨어 개발	100	■ 전자기장 발생 시스템은 전체 시스템 에너지를 공급하는 전원부, 고에너지를 충방전할 수 있는 충전부, 자기장을 발생시키는 자기 유도 코일 프로브, 프로브로 인가되는 에너지를 제어하는 제어부로 구성함 ■ 각 부분을 회로로 구축하여 고에너지 전압이 자기 유도 코일 프로브에 인가될 때 전자기장이 발생되는 것을 확인	특허, 그림 10~16
3	세포시료의 자기장 자극에 효과적인 전자기장 발생을 위한 코일 형태 결정	100	■ 제작된 전자기장 시스템을 바탕으로 제작된 코일의 실제 전자기장 출력 파형을 확인함 ■ 확인 결과를 바탕으로 팬형 솔레노이드(type 1)를 코일 형태로 결정함	특허, 표 7
4	제작된 펄스형 전자기장 시스템을 이용한 시스템 검증	100	■ 문헌조사를 통해 세포 자극에 많이 쓰이는 프로토콜을 찾고 시스템의 효과를 검증함 ■ 이 검증을 위해 10Hz, 0.25% 듀티로 매일 1시간씩 7일간 연골세포를 자극함 ■ 이 실험을 통해 연골세포가 5%정도의 성장을 보임을 확인하여 시스템을 검증	특허, 그림 18~19

국가연구개발 보고서원문 성과물 전담기관인 한국과학기술정보연구원에서 가공·서비스 하는 연구보고서는 동의 없이 상업적 및 기타 영리목적으로 사용할 수 없습니다

5	조직 유사 물질 팬텀을 이용한 자장 자극 시스템 평가	100	■ 지방 조직과 유사한 팬텀을 Glycerol과 Corn syrup을 기반으로 제작 ■ 1Hz, 1T의 프로토콜로 기존의 펄스형 전자기장 발생 장치을 사용하여 팬텀을 자극함 ■ 자극 후 팬텀의 물질변성(조직 단위의 물질변성)을 확인하기는 어려움	그림 35~36
6	지방세포 및 공배양세포(조직)를 이용한 지방분해 자장 자극 파라미터 확립	100	■ 공배양세포(조직)에 1Hz, 1T, 10분/60분, 5일간(매일)의 파라미터로 자극을 진행 ■ 대조군에 비해 유의미한 차이를 보이지 않았음 ■ 자극 5일차에서는 대조군에 비해 지방 분화 정도가 상대적으로 약간 떨어지는 경향을 확인함	학술대회 초록, 그림44, 46
7	줄기세포의 지방 분화 시 지방 분화 억제 효과 평가	100	■ 전자기장의 다양한 파라미터를 통해 hMSC의 지방 분화 억제에 가장 큰 영향을 미치는 프로토콜 확인 ■ 자극 프로토콜 중 10분 자극과 10Hz에서 줄기세포의 지방분화 억제 효과가 유의미한 것으로 확인함	학술대회 초록, 그림 52~59 표 14~20
8	최적화된 자극 방법에 의한 세포 및 조직의 대사물질 정량 분석: 자기공명분광법 시행	100	■ 지방분화세포의 PEMF 자극 효과를 NMR 분광분석법으로 가능함을 확인 ■ MRS를 이용한 PEMF 자극에 대한 물질대사 지표 검색 가능성 확인	그림 63~65 표 22, 23

번호	세부 목표 달성도(%)에 대한 연구자 자체평가 결과
1	펄스형 전자기장에 의한 타겟팅 대상 (세포시료)에 따른 자장 분석 모의실험은 초기 목표를 달성하였으며, 시스템 제작 후 연골세포에 자극을 가한 결과 증식이 활발해지는 것을 확인하였음. 이에 따라 제작된 시스템이 연구 가능한 수준인 것으로 사료됨
2	지방세포 및 지방분화 줄기세포를 이용한 PEMF 효과 검증은 지방세포의 경우에서는 지방 억제 효과가 미비하게 나타났으나 지방분화 줄기세포에서는 저자장, 10Hz, 10분의 조건에서 유의미한 차이를 보이므로 본 연구에서 목표한 바를 확인하였음
3	최적화된 자극 방법에 의한 세포 및 조직의 대사물질 정량 분석에서는 MRS와 NMR을 이용하여 3차원 배양세포의 자기공명분광 신호획득을 가능케 하였으며, PEMF 자극시 지방분화 억제 효과를 증명하였음. 이에 본 연구진이 목표한 결과를 도출할 수 있었음

국가연구개발 보고서원문 성과물 전담기관인 한국과학기술정보연구원에서 가공·서비스 하는 연구보고서는 동의 없이 상업적 및 기타 영리목적으로 사용할 수 없습니다

5. 연구결과의 활용계획

1) 펄스형 전자기장 발생 장치의 설계 기술을 기반으로 비만 치료 외 다양한 분야 적용

- 치료대상이나 위치에 따라 모의실험을 통해 가장 적절한 디자인 선정 작업 필요
- 연구수행 중 터득한 제작 노하우로 시스템 제작 및 안정화
- 펄스형 전자기장 발생 장치를 이용한 다양한 치료대상에 맞는 자극 프로토콜 연구 기반 마련

2) 지방전구세포뿐만 아니라 다른 종류의 세포에 본 연구 방법을 적용

- 세포의 종류에 따라 분화, 증식, 억제 효과가 다르므로 최적화된 프로토콜 확립 필요
- 세포 종류에 맞는 프로토콜을 기반으로 다른 세포의 분화, 증식, 억제에 대한 데이터 수집 필요
- 자극에 의해 세포수준에서 일어나는 과정에서 바이오 마커를 찾아 세포 종류 및 자극 프로토콜 변화에 따른 바이오 마커 제시
- 지방전구세포가 아닌 다른 연구대상이 자기장 자극에 노출되었을 때 나타나는 특성에 대한 연구 기반 마련

3) 자기공명분광법을 위한 3차원 배양법 제시

- 본 연구에서 자기공명분광법을 위한 최적화된 지방세포 3차원 배양법을 기반으로 하여 다른 세포의 3차원 배양법 확장 및 연구 필요

4) 임상용 자기공명장치를 이용한 세포분광분석 시 활용 가능한 펄스열 제시

- 본 연구에서 최종적으로 획득한 자극 프로토콜 또는 다른 세포 자극 시 실험을 통해 획득한 최적화된 자극프로토콜을 임상용 자기공명장치에서 적용하기 위한 연구 필요

5) 자기공명분광법을 이용한 세포 상태 정량화 및 지표 활용

- 자기공명분광법을 이용하여 동일한 세포의 신호를 반복하여 획득함으로써 신뢰성 있는 데이터를 수집하여 전자기장 자극에 의한 세포 상태를 정량화하고 객관적인 지표로써 활용 가능
- 자극에 의한 인체 내부 조직의 변화를 세포 수준으로 측정할 수 있는 방법을 제시함으로써 비침습적이며 세포 수준의 신호 획득 및 분석을 위한 연구 기반 마련

국가연구개발 보고서원문 성과물 전담기관인 한국과학기술정보연구원에서 가공·서비스 하는 연구보고서는 동의 없이 상업적 및 기타 영리목적으로 사용할 수 없습니다

6. 연구과정에서 수집한 해외 과학기술정보

가. 자기장 자극 시뮬레이션 이론

(1) Chris Hovey BSc, Reza Jalinous PhD, THE GUIDE TO MAGNETIC STIMULATION, magstim, 2008
J. Malmivuo and R. Plonsey, Bioelectromagnetism, Oxford University Press, New York (1995)

- 유한차분 시간영역법(FDTD : Finite Difference Time Domain) 방법을 통해 시뮬레이션 진행
- 이 컴퓨터 시뮬레이션은 몇 가지의 가정과 공식을 기반으로 진행됨
- 위의 B라고 표기된 자기장은 시간 영역과 주파수 영역에서 맥스웰 방정식을 통해 표현될 수 있음
- 주파수 영역에서는 고조파 발진 e^{jwt}(여기서 j는 복소수로서 $j^2 = -1$이며, ω는 각주파수로서 $\omega = 2\pi f$이고 t는 시간을 의미)을 통해 표현됨
- 이런 자기장은 아래의 식들로 다양한 전자기장 물리량을 표기할 수 있음

$$\nabla \times E = -\omega B$$

$$\nabla \times H = j\omega B + J$$

$$\nabla \cdot D = \rho$$

$$\nabla \cdot B = 0$$

- 여기서 E는 전계(E-field), D는 변위, B는 자속(B-field), H는 자계(H-field), J는 전류 밀도 필드를 나타내며 전하의 분포는 ρ로 표시됨
- 위의 방정식(맥스웰 방적식) 중 두 번째와 세 번째의 직접적인 결과는 전하 연속 방정식이며 아래와 같이 표기됨

$$\nabla \cdot J + j\omega\rho = 0.$$

- 선형성을 바탕으로 constitutive laws를 따르면 아래의 식과 같이 표기됨

$$D = \epsilon E$$

$$B = \mu H$$

$$J = \sigma E + j_0$$

- 위의 식에서 $\epsilon := \epsilon_0\epsilon_r$는 전기 유전율(electric permittivity), $\mu := \mu_0\mu_r$는 자기 투자율(magnetic permeability), 오믹 손실(ohmic losses)은 전기 전도도(electric conductivity) σ로 표기되며, 소스 전류(source current)는 j0이며 복소 유전율은 $\tilde{\epsilon}$이며 $\tilde{\epsilon} := \epsilon_r\epsilon_0 + \frac{\sigma}{j\omega}$로 정의됨
- 전기장으로부터 자기장 디커플링(decoupling)을 진행
- $\nabla \times A = B$ (Coulomb gauge 내에서, 즉, $\nabla \cdot A = 0$)인 A 벡터 포텐셜(vector potential)은 위의 맥스웰 방정식 중 1번과 4번을 품으로서 만들어짐
- 이는 분해된 헬름홀츠 성분 중 컬이 없는(curl-free) E 필드를 결정하기 위함이며 아래의 식을 따름

$$E = -j\omega A - \nabla\varnothing = E_s + E_i$$

- 이때 $\varnothing$는 스칼라 포텐셜(scalar potential)이고, $\nabla \cdot E_s = -j\omega\nabla \cdot A = 0$ (solenoidal)이며
- $\nabla \times E_i = -\nabla \times \nabla\varnothing = 0$ (irrotational)임

국가연구개발 보고서원문 성과물 전담기관인 한국과학기술정보연구원에서 가공·서비스 하는 연구보고서는 동의 없이 상업적 및 기타 영리목적으로 사용할 수 없습니다

- 새롭게 주어진 포텐셜들을 바탕으로 2번째 맥스웰 방정식을 아래와 같이 나타남

$$\nabla \times \frac{1}{\mu} \nabla \times A = \omega^2 \tilde{\epsilon} A - j\omega \tilde{\epsilon} \nabla \varnothing + j_0$$

- 또한 전하 연속 방정식(charge continuity equation)은 아래의 공식을 따름

$$\nabla \cdot \tilde{\epsilon} \nabla \varnothing = -j\omega \nabla \cdot \tilde{\epsilon} A$$

- 이전의 방정식을 바탕으로 준 정적 근사법(Quasi-static Approximation)을 진행
- 각각의 텀(term)을 연속성 내에서 확인할 때, 아래의 식과 같은 스케일링 특성(scaling property)이 나타남

$$\nabla \cdot \tilde{\epsilon} \nabla \varnothing - term = \bigcirc(\tilde{\epsilon} \varnothing / l_{\varnothing}^2)$$

$$\nabla \cdot \omega \tilde{\epsilon} A - term = \bigcirc(\omega \tilde{\epsilon} A / l_A)$$

- 여기서 $\bigcirc(\bullet)$는 순서(on the order of) 기호를 의미하며 아래의 식과 같이 표현함

$$\bigcirc(x^3) : \lim_{x \to 0} \frac{term}{x^3} = const,$$

- 그리고 l_A 와 $l_{\varnothing}$는 특성 길이(characteristic length)를 나타내고, $\bigcirc(1/l)$는 미분의 스케일링(scaling of a derivative)을 나타냄
- 따라서 스케일링의 $\varnothing$ 크기(magnitude)는 스케일링 특성에서 파생될 수 있으며 아래의 식을 따름

$$\varnothing = \bigcirc(\omega A l_{\varnothing}^2 / l_A).$$

- 암페어 법칙에 같은 방법을 사용하면 아래와 같이 표현할 수 있음

$$\nabla \times \frac{1}{\mu} \nabla \times A - term = \bigcirc(A / \mu l_A^2)$$

$$\omega^2 \tilde{\epsilon} A - term = \bigcirc(\omega^2 \tilde{\epsilon} A)$$

$$j\omega \tilde{\epsilon} \nabla \varnothing - term = \bigcirc(\omega \tilde{\epsilon} \varnothing / l_{\varnothing}) = \bigcirc(\omega^2 \tilde{\epsilon} A l_{\varnothing} / l_A)$$

- 따라서 아래와 같이 표현할 수 있음

$$\frac{\omega^2 \tilde{\epsilon} A - term}{\nabla \times \frac{1}{\mu} \nabla \times A - term} = \bigcirc(\omega^2 \tilde{\epsilon} \mu l_A^2) = \bigcirc\left(\left(\frac{l_A}{\lambda}\right)^2\right)$$

$$\frac{j\omega \tilde{\epsilon} \nabla \varnothing - term}{\nabla \times \frac{1}{\mu} \nabla \times A - term} = \bigcirc(\omega^2 \tilde{\epsilon} \mu l_A l_{\varnothing}) = \bigcirc\left(\frac{l_A l_{\varnothing}}{\lambda^2}\right)$$

- 위의 식에서 용어 $\omega^2 \tilde{\epsilon} \mu$는 k^2와 같으며, k는 파동이고 $k = 2\pi/\lambda$와 같이 정의할 수 있고 λ는 파장을 나타냄
- 그러므로 모든 세포와 물질이 이러한 조건을 만족하면 암페르 법칙으로 근사화할 수 있음

$$\left|\omega^2 \tilde{\epsilon} \mu d^2\right| \ll 1 \quad \Leftrightarrow \quad \left(\frac{d}{\lambda}\right)^2 \ll 1$$

- 또는 실제값을 기준으로 표현되면 아래의 식을 따름

국가연구개발 보고서원문 성과물 전담기관인 한국과학기술정보연구원에서 가공·서비스 하는 연구보고서는 동의 없이 상업적 및 기타 영리목적으로 사용할 수 없습니다

$$\omega^2\epsilon\mu d^2 \ll 1$$

$$\omega\sigma\mu d^2 \ll 1$$

- 여기서 d는 최악의 경우(worst case)를 고려한 것이며, 계산 영역의 직경을 나타냄
- 또한 암페르 법칙은 아래와 식과 같이 감소됨

$$\nabla\times\frac{1}{\mu}\nabla\times A = j_0,$$

- 즉, 벡터 포텐셜 A는 자기장 벡터 포텐셜(A_0)이며 전자장(E)으로부터 완전히 분해됨
- 또한 전체 도메인 Ω에서 $\mu \equiv \mu_0$로 일정하면, 벡터 포텐셜(A_0)는 비오-사바르 법칙(Biot-Savart law)으로 아래와 같이 계산됨

$$A_0(\vec{r}) = \frac{\mu_0}{4\pi}\int_\Omega \frac{j_0(\vec{r'})}{|\vec{r}-\vec{r'}|}d^3\vec{r'}$$

나. 자기장 자극 시뮬레이션 이론

(1) Extracellular Matrix synthesis(세포외 기질 합성)

① Effect of extremely low frequency (ELF) magnetic field exposure on morphological and biophysical properties of human lymphoid cell line (Raji) (N. Santoro, et al., 1997)

- Human B lymphoid cell(Raji)을 대상으로 24시간동안 50 Hz, 2 mT의 PEMF 자극을 인가
- Laurdan 방출분광법과 DPH 형광편광 분석 결과 막 유동성의 감소가 나타났고 세포 골격 성분의 재구성을 야기
- 주사 전자 현미경으로 확인한 결과 자극을 받은 세포에서 미세 융모의 손실이 나타남을 확인

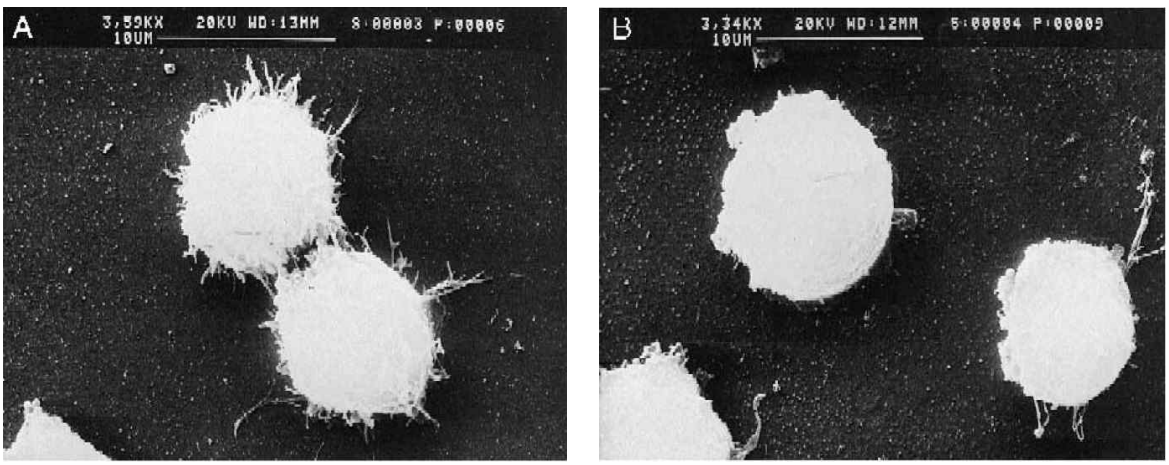


그림 70. Raji 세포의 전자현미경 사진 : (A)자극을 받지 않은 세포, (B)자극을 받은 세포

② Modulation of collagen production in cultured fibroblasts by a low-frequency, pulsed magnetic field (J.Clifford Murray, Richard W. Farndale., 1985)

- Chicken tendon fibroblasts를 대상으로 1시간씩 6일동안 다양한 주기를 가지는 PEMF 자극을 인가하였으며 그 결과 단백질 합성이 증가하는 것을 확인함

③ Effect of exposure to an extremely low frequency- electromagnetic field on the cellular collagen with respect to signaling pathways in osteoblast-like cells (Akira Soda, et al., 2008)

- Mouse osteoblast MC3T3-E1을 대상으로 3일동안 60 Hz, 3 mT의 PEMF 자극을 인가하였을 때 콜라겐 합성을 억제하는 현상을 확인함

④ No Influence of Magnetic Fields on Cell Cycle Progression Using Conditions Relevant for Patients During MRI (Ilka B. Schiffer et al., 2003)

- Tumor cell HL60과 EA2를 대상으로 3일동안 60 Hz, 3 mT의 자기장 자극을 인가하였을 때 강한 G_2/M arrest가 나타났지만 결과적으로 임상용 자기공명영상장치가 cell cycle에는 큰 영향은 주지않는 것을 확인함

⑥ Effects of Exposure to Repetitive Pulsed Magnetic Stimulation on Cell Proliferation and Expression of Heat Shock Protein 70 in Normal and Malignant Cells (Giichiro Tsurita et al., 1999)

- 정상세포와 종양 세포를 대상으로 3시간동안 50 Hz, 34 mT의 RPMS(Repetitive pulsed magnetic stimulation)을 인가했을 때 양쪽 모두 열로 인한 스트레스를 받았으며 특히 종양 세포의 경우 유래한 기관에 따라 다르게 반응하는 것을 확인

(2) Cell differentiation(세포 분화)

① Power-Frequency Magnetic Field Inhibits Adipogenic Differentiation in Human ADSC (María Antonia Martínez, et al., 2015)

- 50 Hz, 100 μT의 PEMFs에 지방전구세포를 42시간동안 자극
- Oil-red-O staining한 결과 자기장 자극에 노출된 지방전구세포의 지방세포 분화율은 47.96±12.47 %로 대조군(100%) 대비 절반가까이 분화율이 감소했다고 보고함

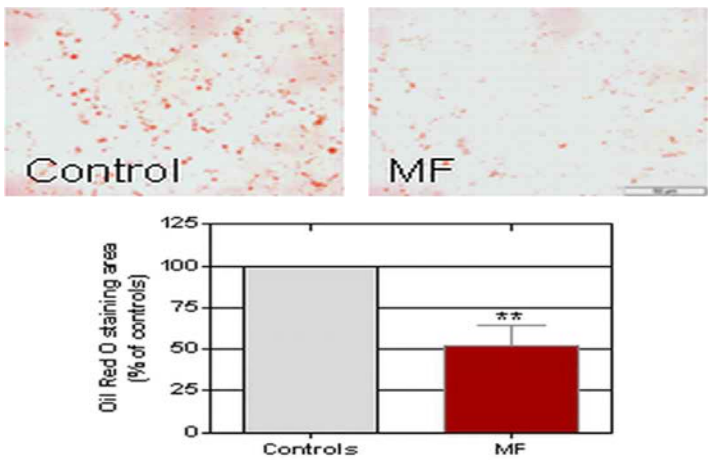


그림 71. 현미경 및 Oil-Red-O staining 분석 결과

② The influence of static magnetic fields on canine and equine mesenchymal stem cells derived from adipose tissue (Monika Marędziak, et al., 2014)

- Eq- and CaAdMSC를 대상으로 0.5 T 자기장 세기를 이용하여 각각 24, 48, 96, 120, 144시간 자극을

국가연구개발 보고서원문 성과물 전담기관인 한국과학기술정보연구원에서 가공·서비스 하는 연구보고서는 동의 없이 상업적 및 기타 영리목적으로 사용할 수 없습니다

인가

- EqAdMSC의 경우 미소낭포의 출현이 활발했지만 CaAdMSC의 경우 분비활동이 감소하는 것을 확인함

③ Effect of pulsed electromagnetic field therapy on the osteogenic and adipogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cell (T. Lu, Y.X. Huang, C. Zhang, M.X. Chai1 and J. Zhang, 2015)

- 골수줄기세포가 지방분화와 골분화를 진행함에 있어 20 Hz, 2 mT PEMF 자극을 12일동안 인가
- RT-PCR 분석 결과 PEMF 자극에 의해 골분화는 촉진 효과를 가져왔지만 지방분화는 억제 효과가 나타남을 확인
- Oil-red-O staining 분석에서도 PEMF 자극이 골수줄기세포의 지방분화를 억제하는 효과가 있음을 재검증함

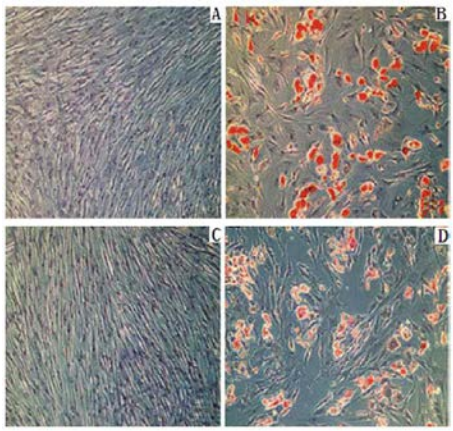


그림 72. Oil-Red-O staining 결과, (A)Staining 전 대조 군, (B)Staining 후 대조 군, (C)Staining 전 실험 군, (D)Staining 후 실험 군

④ Inhibition of Viability, Proliferation, Cytokines Secretion, Surface Antigen Expression, and Adipogenic and Osteogenic Differentiation of Adipose-Derived Stem Cells by Seven-Day Exposure to 0.5 T Static Magnetic Fields (Jian Wang, et al., 2016)

- 0.5 T의 SMF(Static Magnetic Field)를 지방전구세포에 168시간(7일)동안 자극
- 지방세포 분화율을 MTT assay로 측정한 결과 지방분화가 억제됨을 확인했다고 보고함

⑤ Extremely Low Frequency Magnetic Fields Inhibit Adipogenesis of Human Mesenchymal Stem Cells (Leilei Du, et al., 2014)

- 하루에 2시간씩 15일 동안 7.5 Hz, 0.4T의 자기장 자극을 간엽세포에 인가
- 골분화에는 영향을 주지 않았지만 지방분화를 억제하는 효과가 나타남을 확인함

⑥ EMFActs on Rat Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells to Promote Differentiation to Osteoblasts and to Inhibit Differentiation to Adipocytes (Yong Yang, et al., 2010)

- 골수줄기세포에 21일 동안 8시간씩 15 Hz, 1 mT 전자기 자극을 인가
- 지방분화를 억제하고 골분화 촉진이 나타나는 것을 확인함

⑦ Effect of Pulsed Electromagnetic Field on Bone Formation and Lipid Metabolism of Glucocorticoid-Induced Osteoporosis Rats through Canonical Wnt Signaling Pathway (Yuan Jiang et al., 2016)

- 골다공증을 가진 Rat을 대상으로 12주 동안 0.66시간씩 50 Hz, 4 mT로 PEMF 자극을 인가 골 손실이

국가연구개발 보고서원문 성과물 전담기관인 한국과학기술정보연구원에서 가공·서비스 하는 연구보고서는 동의 없이 상업적 및 기타 영리목적으로 사용할 수 없습니다

감소하는 것을 확인함

⑧ Electromagnetic fields enhance chondrogenesis of human adipose-derived stem cells in a chondrogenic microenvironment in vitro (Chung-Hwan Chen et al., 2013)

- PEMF와 SPEMF(Single-pulse electromagnetic field) 자극을 인가하였으며 3일, 5일동안 1 T로 10,30,60번 자극 프로토콜 적용
- PEMF와 SPEMF 모두 연골세포분화의 바이오 마커에 해당하는 유전자가 증가하는 것을 확인함

(3) Bone Regeneration(골 재생)

① Effects of Static Magnetic Field and Pulsed Electromagnetic Field on Viability of Human Chondrocytes in vitro (Š. ŠTOLFA, M. ŠKORVÁNEK, P. ŠTOLFA, J. ROSOCHA, G. VAŠKO, J. SABO, 2007)

- 인간 연골세포를 대상으로 4.5일에 걸쳐 72시간 자극을 21.2 MHz, 3 dBm(0.1V)의 PEMF 자극을 인가한 결과 자기장 자극이 연골 세포 생존성을 향상시킬 수 있다고 보고함

② Effects of Pulsed Electromagnetic Fields on Human Chondrocytes: An In Vitro Study (F. Pezzetti, et al., 1999)

- 인간의 코 및 관절 연골세포를 대상으로 75 Hz, 2.3 mT PEMF를 6, 12, 18, 24, 30 시간동안 자극을 하였으며 RT-PCR 결과 자극을 인가받은 세포가 대조 군 세포보다 세포 분화 촉진을 일으켰다는 결과를 보고함

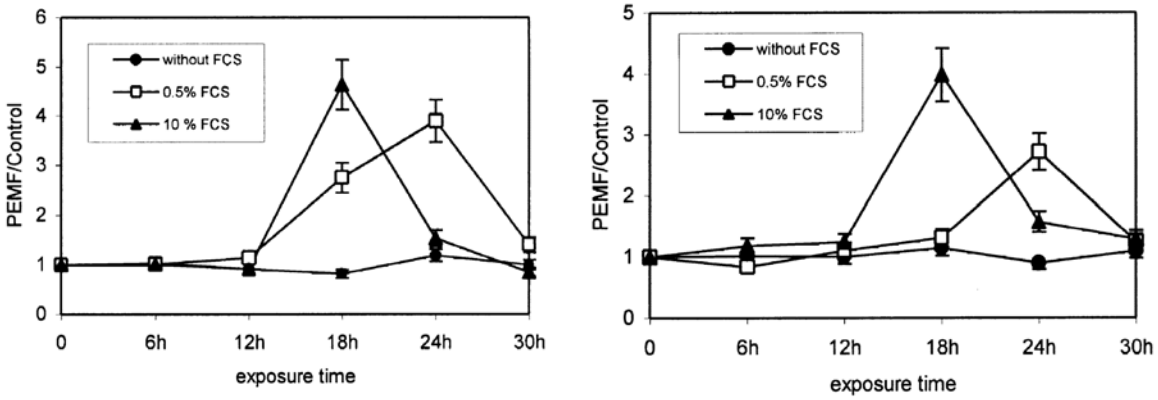


그림 73. (Left)PEMF자극 시간에 따른 코 연골세포의 H-thymidine 비율,
(Right)PEMF자극 시간에 따른 관절 연골세포의 H-thymidine 비율

③ Pulsed Electromagnetic Fields Simultaneously Induce Osteogenesis and Upregulate Transcription of Bone Morphogenetic Proteins 2 and 4 in Rat Osteoblasts in Vitro, BIOCHEMICAL AND BIPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIOS (T. Bodamyali, et al., 1998)

- 관절염을 가진 rat의 골아세포를 대상으로 15 Hz, 1.8 mT의 PEMF 자극을 6일동안 실시하였고 RT-PCR 분석 결과 임상용 PEMF 자극이 연골세포 분화에 긍정적인 영향을 준다는 결과를 보고함

④ Effect of a pulsing electromagnetic field on demineralized bone-matrix-induced bone formation in a Bony defect in the premaxilla of rats (T. Takano-Yamamoto, M. Kawakami, M. Sakuda, 1992)

- 21일동안 100 Hz, 165 μT의 PEMF를 뼈에 결함이 있는 rat에 인가하였을 때 뼈 생성이 활발하게 일어났으며 이는 PEMF 자극이 뼈 생성에 유효한 효과가 있음을 확인함

⑤ Biochemical and morphological study of human articular chondrocytes cultivated in the presence

국가연구개발 보고서원문 성과물 전담기관인 한국과학기술정보연구원에서 가공·서비스 하는 연구보고서는 동의 없이 상업적 및 기타 영리목적으로 사용할 수 없습니다

of pulsed signal therapy (A Fioravanti, F Nerucci, G Collodel, R Markoll, R Marcolongo, 2002)

- 알지네이트 겔에 배양된 골관절염 환자의 연골세포를 대상으로 15 Hz, 1.5 mT의 PEMF 자극을 인가했을 때, 프로테오글리칸의 농도 분석결과 농도가 증가한 것을 확인함

⑥ Pulsed Electromagnetic Field Stimulation of MG63 Osteoblast-like Cells Affects Differentiation and Local Factor Production (C. H. Lohmann et al., 2000)

- 인간 조골 유사 세포 MG-63을 대상으로 1, 2, 4일동안 15Hz, 1.8 mT의 PEMF 자극을 8시간씩 인가하였을 때 골 분화 및 알칼린 포트파타아제 활동, 콜라겐 형성, 오스테오칼신 합성 증가에도 영향을 준 것을 확인했다고 보고함

(4) Observation of changes in cell status(세포 상태 변화의 관찰)

① Effects of electromagnetic stimulation on onsteogenic differentiation of human mesenchymal stromal cells seeded onto gelatin cryogel (E. SAINO, et al., 2011)

- 중간엽 간질 세포를 대상으로 28일동안 75 Hz, 2 mT의 자기장 자극을 0.33 시간씩 인가한 결과 세포 증식, 분화 증가와 골 세포외기질 단백질의 표면 코팅도 강해진 것을 확인

② Control of orientation of rat Schwann cells using an 8-T static magnetic field (Yawara Eguchi, et al., 2003)

- rat의 슈반 세포(Schwann cell)를 대상으로 8 T의 자기장을 30시간동안 인가하였으며 자극에 의해 슈반 세포 배열이 방향성을 지니게 된 것을 확인

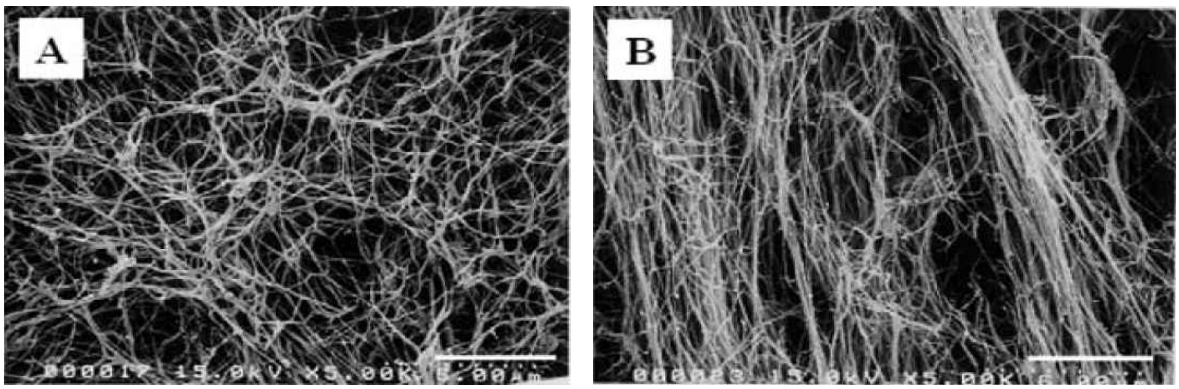


그림 74 콜라겐의 전자현미경 영상. (A)대조 군, (B)실험 군

③ Power Frequency Magnetic Fields Affect the p38 MAPK-Mediated Regulation of NB69 Cell Proliferation Implication of Free Radicals (María Antonia Martínez, et al., 2016)

- 신경아세포종 NM69를 대상으로 50 Hz, 0.1 mT의 자기장 자극을 2, 24, 42, 63시간 자극을 인가하였으며 그 결과 p38, JNK, ERK1/2의 일시적인 활동을 이끌어냄

④ Moderate strength (0.23-0.28 T) static magnetic fields (SMF) modulate signaling and differentiation in human embryonic cells (Zhiyun Wang et al., 2009)

- 인간 배양체 유도 세포(hEBD)를 대상으로 5일동안 0.25 시간씩 255 mT의 자기장을 인가함으로써 지질막에서 신경계통으로의 분화를 포함한 세포 수준 반응이 어떻게 전달되는 지를 설명하는 프레임 워크를 제공함

Pulsed Electromagnetic Field Assisted in vitro Electroporation: A Pilot Study (Vitalij Novickij, et al., 2016)

국가연구개발 보고서원문 성과물 전담기관인 한국과학기술정보연구원에서 가공·서비스 하는 연구보고서는 동의 없이 상업적 및 기타 영리목적으로 사용할 수 없습니다

- Saccharomyces cerevisiae와 Candida lusitaniae 세포를 대상으로 하여 3.0 T, 6.0 T, 9.0 T의 자기장 세기로 100, 150, 200, 250 ㎲동안 인가하였을 때 막의 투과성을 나타내는 Propidium Iodide(PI) 형광 세포의 수가 증가한 것을 확인함

⑤ Low Intensity and Frequency Pulsed Electromagnetic Fields Selectively Impair Breast Cancer Cell Viability (Sara Crocetti et al., 2013)

- 유방암 세포인 MCF-7을 대상으로 3, 5일동안 20 Hz, 50 Hz, 2 mT, 3 mT, 5 mT를 매개변수로 가지는 PEMF 자극을 0.5, 1.0, 1.5시간씩 자극을 인가한 결과 자극시간과 세기를 증가할수록 유방암 세포가 타격을 입었으며 정상 세포인 MCF-10은 영향을 받지 않은 것을 확인하고 항암 전략 중 하나가 될 수 있음을 제시함

(5) Pain relief(통증 완화)

① Evaluation of electromagnetic fields in the treatment of pain in patients with lumbar radiculopathy or the whiplash syndrome (Thuile CH, Walzl M., 2002)

- 등통증과 휘플래시 증후군 환자를 대상으로 22일동안 64 Hz, 10, 20, 30 μT PEMF 자극을 26분씩 인가
- 평균적으로 정상인보다 약 3일정도 서서히 통증 완화 증상을 보이기 시작했으며 통증 완화 효과가 있음을 확인함

표 x. 통증이 완화되기까지의 간격(d=days, ° =degrees, *=statistically significant)

Parameter	Magnetic field		Controls		p-value
	before	after	before	after	
Free of pain/walking	-	8.2±0.5d	-	11.7±0.5	< 0.04*
Las`egue (normal range: 70-90◦)	36.2±3.7°	68.4±3.8°	37.9±2.8°	49.3±4.1°	< 0.05*

② Extremely Low Frequency Pulsed Electromagnetic Field Designed for Antinociception Does Not Affect Microvascular Responsiveness to the Vasodilator Acetylcholine (Julia C. McKay et al., 2010)

- 등은 PEMF 자극이 rat 뼈의 미소혈관계의 혈류 흐름에 끼치는 영향을 측정하기 위해 72 Hz, 0.225, 2.25 mT 자극을 0.5 시간만큼 인가하였을 때 혈관의 근원성이나 심박수 매개변수에는 영향을 끼치지 않았지만 호흡억제를 유도하는 마취 성분이 대조 군에 비해 감소한 것을 확인함

(6) Wound healing(상처 치료)

① Pulsed Electromagnetic Fields Accelerate Wound Healing in the Skin of Diabetic Rats (Iran Goudarzi, et al., 2010)

- 당뇨병에 의해 치료 속도가 느려진 rat을 대상으로 20 Hz, 8 mT 10일동안 1시간씩 PEMF 자극을 인가했을 때 자극을 받지 않은 rat에 비해 치료 속도가 빨라진 것을 토대로 PEMF 자극이 상처 치료에 도움이 된다는 것을 확인함

국가연구개발 보고서원문 성과물 전담기관인 한국과학기술정보연구원에서 가공·서비스 하는 연구보고서는 동의 없이 상업적 및 기타 영리목적으로 사용할 수 없습니다

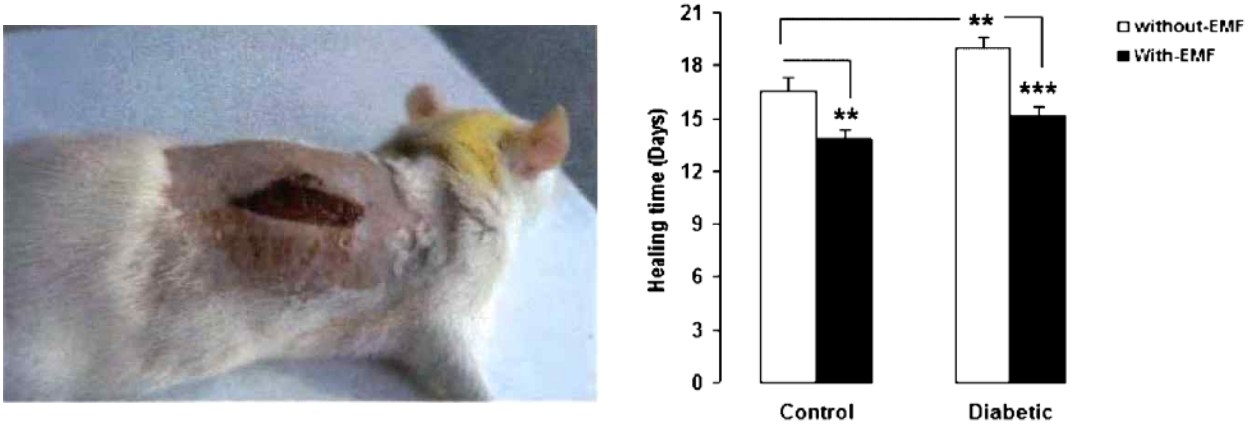


그림 75. (Left)rat의 상처 사진, (Right)대조 군과 실험 군간의 자극이 유무에 따른 치료 시간

(7) Antiinflammatory(소염제)

① Low frequency and low intensity pulsed electromagnetic field exerts its antiinflammatory effect through restoration of plasma membrane calcium ATPase activity (Ramasamy Selvam, et al., 2007)

- 류마티스성 관절염을 가진 동물을 대상으로 42일동안 5 Hz, 4 μT의 PEMF 자극을 1.5시간씩 인가했을 때 삼출방지효과가 일어나면서 회복에 도움이 되었다고 보고함

(8) Neural Tissue(신경 조직)

① Cellular level studies and coil system design for transcranial magnetic stimulation, Iowa State University, Graduate Theses and Dissertations (Yiwen Meng, 2015)

- N27 도파민성 신경 세포를 대상으로 0.25 Hz, 0.55 Ma/m의 TMS로 0.5시간 자극을 한 결과 세포 수준의 TMS 메커니즘을 이해할 수 있는 기반이 될 것으로 제시함

☞이런 다양한 실험이 해외에서도 진행되고 있지만 가장 큰 문제점은 자극 효과가 나타났다하더라도 세포 또는 조직이나 개체에 가하는 자극 프로토콜의 파형형태, 주파수, 자기장 세기, 자극 기간이 확립되지 않은 상태로 단순히 연구결과만을 제시하고 있는 실정임

국가연구개발 보고서원문 성과물 전담기관인 한국과학기술정보연구원에서 가공·서비스 하는 연구보고서는 동의 없이 상업적 및 기타 영리목적으로 사용할 수 없습니다

7. 주관연구책임자 대표적 연구실적

번호	논문명/특허명/기타	소속기관명	역할	논문게재지/특허등록국가	논문게재일/특허등록일	특기사항(I.F.)
1	균일 자기장 세포 자극 시스템(Cell stimulation system with uniform magnetic field)	인제대학교	발명인	대한민국	2017.11.30	

8. 참고문헌

[1] 보건복지부, 국민건강영양조사, 2015
[2] 보건뉴스, 성인남성 10명 중 4명 비만 '21세기 신종전염병', 2016 http://www.bokuennews.com/news/article.html?no=129940
[3] JTBC 뉴스-사회, 비만에 사회적 비용 연 6.7조…음주·흡연 합하면 23조, 2016 http://news.jtbc.joins.com/article/article.aspx?news_id=NB11139703&pDate=20160104
[4] 보건복지부, 국가비만관리 종합대책(안), 2005
[5] L. Mirbahai et al., 1H magnetic resonance spectroscopy metabolites as biomarkers for cell cycle arrest and cell death in rat glioma cells. Int J Biochem Cell Biol, 43(7); 990-1001, 2011
[6] C. Shi et al., HRMAS 1H-NMR measured changes of the metabolite profile as mesenchymal stem cells differentiate to targeted fat cells in vitro: implications for non-invasive monitoring of stem cell differentiation in vivo. J Tissue Eng Regen Med, 2; pp.482-490, 2008
[7] Maria L.A et al., Nuclear magnetic resonance methods of monitoring cell metabolism. Ani Cell Biotech, 8(3); pp.165-175, 1999
[8] 헬스포커스 뉴스, 국내 비만치료제 시장, 전쟁의 서막, 2016 http://www.healthfocus.co.kr/news/articleView.html?idxno=59848
[9] 대한비만학회 홈페이지 - 비만상식
[10] 강남서초내일신문, 수술없는 부분비만 치료술...복부 허벅지 옆구리 히프 지방세포만 선택해 간단히 제거, 2008
[11] 미디어팬-의학칼럼, 냉동지방분해술 부작용의 원인과 처방, 2017 http://www.mediapen.com/news/view/235354
[12] 송미영, 김호준, 이명종, "비수술적 부분비만 치료 효과에 관한 근거 중심적 연구", 대한한방비만학회지 6(1);1-10, 2006
[13] Markov MS, "Magnetic field therapy: a review",Electromagn Biol Med 26(1);1-23, 2007
[14] 메디인 홈페이지 (http://medi-in.com/bbs/board.php?bo_table=product06&wr_id=2)
[15] 약업닷컴-뉴스, 일석이조 의료기기 '비너스 프리즈' 인기몰이, 2014
[16] Yong Yang et al., EMF Acts on Rat Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells to Promote Differentiation to Osteoblasts and to Inhibit Differentiation to Adipocytes, Bioelectromagnetics, Bioelectromagnetics., vol.31, pp.277-285, 2010
[17] N. Santoro, et al. “Effect of extremely low frequency (ELF) magnetic field exposure on morphological and biophysical properties of human lymphoid cell line (Raji)”, Biochimica et Biophysica Acta vol.1357:281-290, 1997
[18] J.Clifford Murray, Richard W. Farndale, “Modulation of collagen production in cultured fibroblas

국가연구개발 보고서원문 성과물 전담기관인 한국과학기술정보연구원에서 가공·서비스 하는 연구보고서는 동의 없이 상업적 및 기타 영리목적으로 사용할 수 없습니다

ts by a low-frequency, pulsed magnetic field", BBA. vol.838: 98-105, 1985
[19] Akira Soda, et al. "Effect of exposure to an extremely low frequency- electromagnetic field on the cellular collagen with respect to signaling pathways in osteoblast-like cells", The Journal of Medical Investigation vol.55:267-278, 2008
[20] Ilka B. Schiffer et al. "No Influence of Magnetic Fields on Cell Cycle Progression Using Conditions Relevant for Patients During MRI", Bioelectromagnetics 24:241-250, 2003
[21] Giichiro Tsurita et al. "Effects of Exposure to Repetitive Pulsed Magnetic Stimulation on Cell Proliferation and Expression of Heat Shock Protein 70 in Normal and Malignant Cells", Biochemical and Biophysical Research Communications 261:689-694, 1999
[22] Monika Marędziak, et al. "The influence of static magnetic fields on canine and equine mesenchymal stem cells derived from adipose tissue", In Vitro Cell Dev Biol Anim. vol.50(6):562-71, 2014
[23] T. Lu, Y.X. Huang, C. Zhang, M.X. Chai1 and J. Zhang, "Effect of pulsed electromagnetic field therapy on the osteogenic and adipogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cell", Genetics and Molecular Research, vol.14(3):11535-11542, 2015
[24] María Antonia Martínez, et al. "Power-Frequency Magnetic Field Inhibits Adipogenic Differentiation in Human ADSC", Cell Physiol Biochem vol.37:2297-2310, 2015
[25] Jian Wang, et al. "Inhibition of Viability, Proliferation, Cytokines Secretion, Surface Antigen Expression, and Adipogenic and Osteogenic Differentiation of Adipose-Derived Stem Cells by Seven-Day Exposure to 0.5 T Static Magnetic Fields", Stem Cells International vol.7168175:12, 2016
[26] Leilei Du, et al. "Extremely Low Frequency Magnetic Fields Inhibit Adipogenesis of Human Mesenchymal Stem Cells", Bioelectromagnetics vol 35:519-530, 2014
[27] Yong Yang, et al. "EMFActs on Rat Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells to Promote Differentiation to Osteoblasts and to Inhibit Differentiation to Adipocytes", Bioelectromagnetics vol.31:277-285, 2010
[28] Yuan Jiang et al. "Effect of Pulsed Electromagnetic Field on Bone Formation and Lipid Metabolism of Glucocorticoid-Induced Osteoporosis Rats through Canonical Wnt Signaling Pathway",Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine vol.2016, 2016
[29] Chung-Hwan Chen et al. "Electromagnetic fields enhance chondrogenesis of human adipose-derived stem cells in a chondrogenic microenvironment in vitro", J Appl Physiol 114:647-655, 2013
[30] Š. ŠTOLFA, M. ŠKORVÁNEK, P. ŠTOLFA, J. ROSOCHA, G. VAŠKO, J. SABO, "Effects of Static Magnetic Field and Pulsed Electromagnetic Field on Viability of Human Chondrocytes in vitro", Physio. Res. vol. 56:S45-S49, 2007
[31] F. Pezzetti, et al. "Effects of Pulsed Electromagnetic Fields on Human Chondrocytes: An In Vitro Study", Calcif Tissue Int. vol.65:396-401, 1999
[32] T. Bodamyali, et al. "Pulsed Electromagnetic Fields Simultaneously Induce Osteogenesis and Upregulate Transcription of Bone Morphogenetic Proteins 2 and 4 in Rat Osteoblasts in Vitro, BIOCHEMICAL AND BIPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIOS". vol.250:458-461, 1998
[33] T. Takano-Yamamoto, M. Kawakami, M. Sakuda, "Effect of a pulsing electromagnetic field on demineralized bone-matrix-induced bone formation in a Bony defect in the premaxilla of rats", J Dent Res. vol.71(12):1920-1925, 1992
[34] A Fioravanti, F Nerucci, G Collodel, R Markoll, R Marcolongo, 'Biochemical and morphological study of human articular chondrocytes cultivated in the presence of pulsed signal therapy', Ann Rheum Di

국가연구개발 보고서원문 성과물 전담기관인 한국과학기술정보연구원에서 가공·서비스 하는 연구보고서는 동의 없이 상업적 및 기타 영리목적으로 사용할 수 없습니다

s, vol.61(11):1032-1033, 2002
[35] C. H. Lohmann et al. “Pulsed Electromagnetic Field Stimulation of MG63 Osteoblast-like Cells Affects Differentiation and Local Factor Production”, Journal of Orthopaedic Research 18:637-646, 2000
[36] E. SAINO, et al. “Effects of electromagnetic stimulation on onsteogenic differentiation of human mesenchymal stromal cells seeded onto gelatin cryogel”, Int. J. Immunopathol. Pharmacol. vol.24(1):1-6, 2011
[37] Yawara Eguchi, et al. “Control of orientation of rat Schwann cells using an 8-T static magnetic field”, Neuroscience Letters vol.351:130-132, 2003
[38] María Antonia Martínez, et al. "Power Frequency Magnetic Fields Affect the p38 MAPK-Mediated Regulation of NB69 Cell Proliferation Implication of Free Radicals", Int. J. Mol. Sci. vol.17, 510, 2016
[39] Zhiyun Wang et al. “Moderate strength (0.23-0.28 T) static magnetic fields (SMF) modulate signaling and differentiation in human embryonic cells”, BMC Genomics 10(356):1-23, 2009
[40] Vitalij Novickij, et al. "Pulsed Electromagnetic Field Assisted in vitro Electroporation: A Pilot Study", Sci. Rep. vol.6; 33537, 2016
[41] Sara Crocetti et al. “Low Intensity and Frequency Pulsed Electromagnetic Fields Selectively Impair Breast Cancer Cell Viability”, PLoS ONE 8(9):1-13, 2013
[42] Thuile CH, Walzl M. “Evaluation of electromagnetic fields in the treatment of pain in patients with lumbar radiculopathy or the whiplash syndrome”, NeuroRehabilitation, vol.7:63-67, 2002
[43] Julia C. McKay et al. “Extremely Low Frequency Pulsed Electromagnetic Field Designed for Antinociception Does Not Affect Microvascular Responsiveness to the Vasodilator Acetylcholine”, Bioelectromagnetics 31:64-76, 2010
[44] Iran Goudarzi, et al. “Pulsed Electromagnetic Fields Accelerate Wound Healing in the Skin of Diabetic Rats”, Bioelectromagnetics vol.31:318-323, 2010
[45] Ramasamy Selvam, et al. “Low frequency and low intensity pulsed electromagnetic field exerts its antiinflammatory effect through restoration of plasma membrane calcium ATPase activity”, Life Sciences vol.80:2403-2410, 2007
[46] Yiwen Meng, “Cellular level studies and coil system design for transcranial magnetic stimulation, Iowa State University, Graduate Theses and Dissertations”, Paper 14511. 2015

국가연구개발 보고서원문 성과물 전담기관인 한국과학기술정보연구원에서 가공·서비스 하는 연구보고서는 동의 없이 상업적 및 기타 영리목적으로 사용할 수 없습니다

9. 연구성과

사업명	도약연구지원사업(전략)(상향식)	연구책임자	문치웅	주관기관	인제대학교
과제번호	2014R1A2A1A11053868	과제명	펄스형 전자기장 자극의 지방분해 영향에 관한 연구		

※산학강좌,기술이전 및 기술평가는 현재 입력 받지 않는 항목입니다.

과학기술/학술적 연구성과(단위 : 건)

전문학술지 논문게재				초청 강연 실적	학술대회 논문발표		지식재산권				수상 실적	출판실적	
국내논문		국외논문			국내	국제	출원		등록			저역서	보고서
SCI	비SCI	SCI	비SCI				국내	국외	국내	국외			
0	0	0	0	0	3	1	1	0	0	0	0	0	0

인력양성 및 연구시설(단위 : 명,건)

학위배출		국내외 연수지원				산학강좌	연구기자재
박사	석사	장기		단기			
		국내	국외	국내	국외		
1	0	0	0	0	0	0	0

국제협력(단위 :명,건)

과학자교류		국제협력기반			학술회의개최
국내과학자 해외파견	외국과학자 국내유치	MOU체결	국제공동연구	국제사업참여	학술회의개최(국내,국제 통합)
0	0	0	0	0	0

산업지원 및 연구성과 활용(단위 : 건)

기술확산				연구성과활용(사업화 및 후속연구과제 등)				
기술실시계약	기술이전	기술지도	기술평가	후속연구추진	사업화추진중	사업화완료	기타목적활용	기술마케팅
0	0	0	0	0	0	0	0	0

지식재산권 성과정보

과제번호	출원등록연월	재산권구분	출원등록 구분	발명제목	출원등록인	출원등록국	발명자명	출원등록번호	활용형태	기여도
2014R1A2A1A11053868	20171130	특허	출원	균일 자기장 세포 자극 시스템	인제대학교 산학협력단	대한민국	문치웅, 김태형, 천송이, 이민우	10-2017-0162664	보유기관자체 활용	100

국가연구개발 보고서원문 성과물 전담기관인 한국과학기술정보연구원에서 가공·서비스 하는 연구보고서는 동의 없이 상업적 및 기타 영리목적으로 사용할 수 없습니다

학술대회 논문발표 성과정보						
과제번호	발표년월	학술대회명	저자	논문제목	학술대회구분	개최국
2014R1A2A1A11053868	201605	대한의용생체공학회 춘계학술대회	김태형, 천송이, 김동혁, 문치웅	세포자극 용 균일펄스전자기장 발생 장치 개발	국내학술대회	대한민국
2014R1A2A1A11053868	201711	2017 대한의용생체공학회 추계학술대회	천송이, 서솔아, 김태형, 이민우, 도대국, 문치웅	핵자기공명분광법 Locking 물질의 세포 독성에 관한 연구: D2O 와 DMSO-D6	국내학술대회	대한민국
2014R1A2A1A11053868	201711	2017 대한의용생체공학회 추계학술대회	김태형, 천송이, 이민우, 도대국, 서솔아, 문치웅	연골세포 증식을 위한 펄스형 전자기장 자극의 매개변수 효과	국내학술대회	대한민국
2014R1A2A1A11053868	201610	BMES2016	Song-I Chun, Tae hyung Kim, Chi-woong Mun	Evaluation of pulsed electromagnetic field exposure system for chondrocyte proliferation	국제학술대회	미국

학위배출인력 성과정보							
과제번호	학위취득연월	학위구분	학위취득자				진로
			성명	성별	대학	학과	
2014R1A2A1A11053868	201708	박사	김태형	남성	인제대학교	융합의과학과	취업(박사후연구원 포함)

10. 국가과학기술지식정보서비스에 등록한 연구시설·장비 현황

11. 연구개발과제 수행에 따른 연구실 등의 안전조치 이행실적

1) 기술적 위험 요소 분석

1.1.2.1.1.1. 가. 퇴실점검

참여연구원의 연구활동에 사용되는 기계, 기구, 전기, 약품, 병원체 등의 보관상태 및 보호장비의 관리 실태 등을 매 퇴실시마다 육안으로 점검을 실시하며 퇴실점검표를 구비 하여 최종 퇴실자가 매 퇴실 시 마다 작성한다.

1.1.2.1.1.2. 나. 일상점검

참여연구원의 연구활동에 사용되는 기계, 기구, 전기, 약품, 병원체 등의 보관상태 및 보호장비의 관리 실태 주 1회 육안으로 실시한다.

1.1.2.1.1.3. 다. 정기점검

법적 자격을 갖춘 자가 연구활동에 사용되는 기계, 기구, 전기, 약품, 병원체 등의 보관상태 및 보호 장비

국가연구개발 보고서원문 성과물 전담기관인 한국과학기술정보연구원에서 가공·서비스 하는 연구보고서는 동의 없이 상업적 및 기타 영리목적으로 사용할 수 없습니다

의 관리 실태 등을 안전점검기기 등을 갖추어 연 1회 이상 실시한다.

1.1.2.1.1.4. 라. 특별안전점검

폭발사고, 화재사고 등 참여연구원의 안전에 치명적인 위험을 야기할 우려가 있을 경우 실시하는 점검으로 점검 사유가 발생할 경우에 실시한다.

1.1.2.1.1.5. 마. 정밀안전진단

법적 자격을 갖춘 자가 유해, 위험물질 및 시설, 장비를 취급하는 연구실을 대상으로 실시하는 진단으로 2년마다 1회 실시한다

2) 안전 관리 대책

가. 참여연구원의 교육훈련

연 2회 인제대학교 방재연구센터에서 진행하는 연구실안전교육에 참석하여 연구실안전의 중요성, 연구실안전환경조성법, 교내규정, 소방안전, 개인보호구 활용과 관리 등에 관한 교육을 받아야 하며 교육내용을 평가 하며 이수하여야한다. 만약 평가에 합격하지 못한 경우는 교육 미이수자로 처리 되어 재수강을 하여야 한다.

나. 참여연구원의 건강검진 실시

인제대학교 방재연구센터에서는 연구실 안전환경조성법 제18조에 근거하여 연구활동종사자의 건강검진 실시를 하고 있으며 건강검진을 원하는 참여연구원은 건강검진 신청 기간 내에 신청하여 건강검진을 받도록 한다.

다. 참여연구원의 보험가입

참여연구원은 인제대학교 방재연구센터에서 관리하는 연구활동종사자 상해보험에 가입하여 실험 도중 상해를 당했을 경우에 정해진 절차를 따라 신고 및 보고서 제출을 통하여 보험금을 지급 받을 수 있도록 한다.

라. 연구실안전 확보 계획

1) 실험 · 연구실 내 정리정돈을 철저히 한다.
2) 실험실 내 음식물 반입을 금한다.
3) 실험복은 전신을 가릴 수 있고, 활동이 용이하며, 청결해야 한다.
4) 실험 전, 관련 자료의 내용을 미리 숙지하고 실험의 내용과 조작 순서를 충분히 이해해 둔다.
5) 유해인자별 적정한 보호구(안면보호구, 보안경, 안전장갑 등)를 착용한다.
6) 실험 후에는 기구, 시약 등을 실험 전과 같은 상태로 정리 정돈한다.
7) 실험 폐기물은 반드시 정해진 지침에 따라 별도 처리한다.
8) 퇴실 시에는 점검을 실시하고, 반드시 퇴실점검표를 작성한다.
9) 비상사태 발생에 따른 대처를 위해 절차, 비상연락망을 확보한다.
10) 상해사고 발생 시에는 적절한 응급조치를 취하며 필요시 병원으로 후송한다.

12. 기타사항

국가연구개발 보고서원문 성과물 전담기관인 한국과학기술정보연구원에서 가공·서비스 하는 연구보고서는 동의 없이 상업적 및 기타 영리목적으로 사용할 수 없습니다

[별첨1]

〈 대 표 연 구 실 적 〉

대표연구실적 요약문			
연구업적 제목	균일 자기장 세포 자극 시스템(Cell stimulation system with uniform magnetic field)		
연구업적 유형	학술지게재논문( ) 저서( ) 역서( ) 특허(√) 국제학회 초청강연( ) 학술지 편집위원 참여( ) 기술이전( )		
게재연도	2017		
주관연구책임자 또는 참여연구원 성명	문치웅	참여자수	4
SCI 등재 여부		IF 및 인용횟수 (SCI)	
SCOPUS 등재 여부		피인용횟수 (SCOPUS)	

요 약 문

등록일 : 2017.11.30

등록국가 : 대한민국

비침습적인 시변 자기장으로 생체 내의 유도 이온 전류에 의한 자극 효과로써 최근 근골격계 기능 장애에 대한 비침습적, 비접촉적인 적절한 시술방법의 하나로 자기장 자극 치료법이 폭넓게 연구되고 있다. 특히 자기장의 파형, 세기, 주파수 또는 자극 횟수 등의 변수에 대한 연구의 일환으로 세포, 동물 및 인체에 대한 임상실험 결과들이 단편적으로 보고되고 있으나, 각 변수들의 의존성에 관한 체계적인 연구는 아직 이루어지지 않고 있는 실정이다. 또한 세포 실험을 통한 효능 분석에서 자기장 자극 장치는 자기장이 가해지는 시료 부위 내 공간에서의 자기장 분포가 균일하지 않다는 문제를 가지고 있어 세포 수준에서 자기장에 의한 정확한 자극이 어렵고 이로 인해 샘플에서 실험의 결과가 상이하게 나올 수 있는 결함이 존재한다. 이러한 문제를 해결하기 위해 세포를 배양할 수 있는 세포 배양 공간부와 이곳에 균일한 자기장을 인가하여 세포 배양 공간부에 안치된 세포의 활성화에 영향을 줄 수 있도록 세포 배양 공간부를 중심으로 소정 간격으로 상하로 배치된 한 쌍의 자기장발생부 및 자기장발생부의 자기장 발생 여부를 제어하는 제어부를 포함하여 하나의 자기장 자극 장치를 개발하였다.

연구 목표 및 연구내용과의 연관성	기대성과 및 파급 효과
• 컴퓨터 모의실험을 통한 코일 선정 – 시료가 놓이는 위치에 균일한 자기장을 인가하기 위해 코일 타입, 권선 수, 코일의 크기, 코일 간 간격 등을 변수로 설정하여 최적의 조건을 선정함 • 지방세포 및 지방분화 줄기세포를 이용한 PEMF 효과 평가 – 시스템 제작 후 지방 세포 및 지방분화 줄기세포를 이용한 PEMF 효과를 평가하기 위해 지방분화 줄기세포에 자기장의 세기, 주파수, 지극 시간을 변수로 설정하고 이들을 변화시켜가며 자극 조건에 따른 지방분화억제 정도를 확인함 ☞ 자기장 자극 장치 제작 및 장치 효과를 평가하는 과정이 연구계획서 상의 목표 중 일부에 포함됨	• 펄스형 전자기장 발생 장치를 이용한 지방분화억제뿐만 아니라 다른 종류의 세포에도 적용하여 세포 분화 촉진 또는 억제와 관련된 연구 기반을 마련할 수 있음 • 단순히 세포의 분화 촉진이나 억제 관측을 위한 연구가 아닌 다양한 세포에 영향을 주는 최적화된 프로토콜을 확립하여 자기장 자극을 이용한 치료기기발전에 기여할 수 있음 • 또한 세포 수준의 자극 효과 연구 외에 펄스형 전자기장 발생 장치 제작 노하우를 이용하여 보다 안정적인 자기장 자극 치료기기 제작에 기여할 수 있음

국가연구개발 보고서원문 성과물 전담기관인 한국과학기술정보연구원에서 가공·서비스 하는 연구보고서는 동의 없이 상업적 및 기타 영리목적으로 사용할 수 없습니다

〈 대표적 연구실적 사본 〉

관 인 생 략

출 원 번 호 통 지 서

출 원 일 자	2017.11.30
특 기 사 항	심사청구(유) 공개신청(무)
출 원 번 호	10-2017-0162664 (접수번호 1-1-2017-1196078-59)
출원인 명칭	인제대학교 산학협력단(2-2005-012907-9)
대리인 성명	위병갑(9-2004-000155-3)
발명자 성명	문치웅 김태형 천승이 이민우
발명의 명칭	균일 자기장 세포 자극 시스템

특 허 청 장

<< 안내 >>

1. 귀하의 출원은 위와 같이 정상적으로 접수되었으며, 이후의 심사 진행상황은 출원번호를 통해 확인하실 수 있습니다.

2. 출원에 따른 수수료는 접수일로부터 다음날까지 동봉된 납입영수증에 성명, 납부자번호 등을 기재하여 가까운 우체국 또는 은행에 납부하여야 합니다.
※ 납부자번호 : 0131(기관코드) + 접수번호

3. 귀하의 주소, 연락처 등의 변경사항이 있을 경우, 즉시 [특허고객번호 정보변경(경정), 정정신고서]를 제출하여야 출원 이후의 각종 통지서를 정상적으로 받을 수 있습니다.
※ 특허로(patent.go.kr) 접속 > 민원서식다운로드 > 특허법 시행규칙 별지 제5호 서식

4. 특허(실용신안등록)출원은 명세서 또는 도면의 보정이 필요한 경우, 등록결정 이전 또는 의견서 제출기간 이내에 출원서에 최초로 첨부된 명세서 또는 도면에 기재된 사항의 범위 안에서 보정할 수 있습니다.

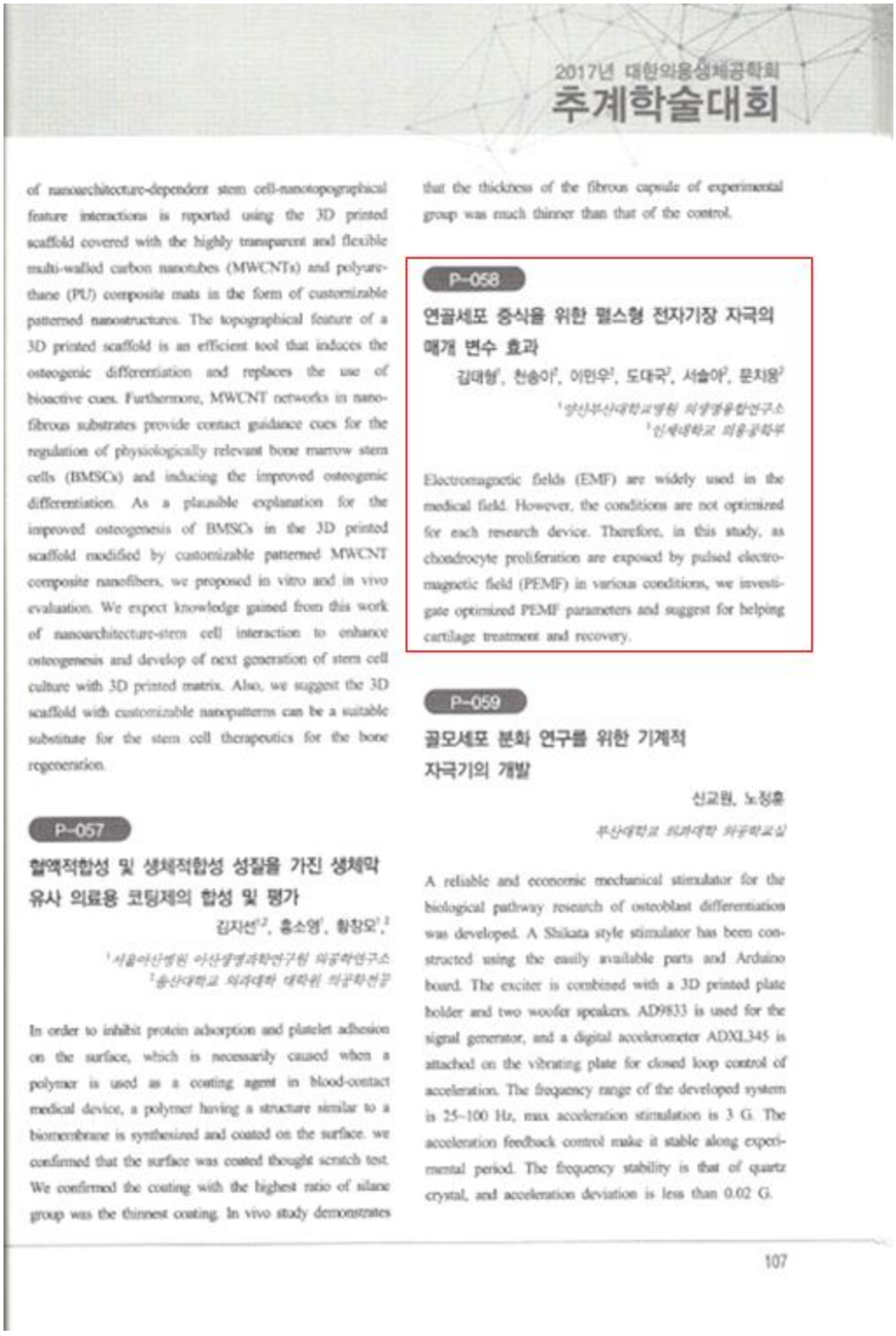
5. 외국으로 출원하고자 하는 경우 PCT 제도(특허·실용신안)나 마드리드 제도(상표)를 이용할 수 있습니다. 국내출원일을 외국에서 인정받고자 하는 경우에는 국내출원일로부터 일정한 기간 내에 외국에 출원하여야 우선권을 인정받을 수 있습니다.
※ 제도 안내 : http://www.kipo.go.kr-특허마당-PCT/마드리드
※ 우선권 인정기간 : 특허·실용신안은 12개월, 상표·디자인은 6개월 이내
※ 미국특허상표청의 선출원을 기초로 우리나라에 우선권주장출원 시, 선출원이 미공개상태이면, 우선일로부터 16개월 이내에 미국특허상표청에 [전자적교환허가서(PTO/SB/39)]를 제출하거나 우리나라에 우선권 증명서류를 제출하여야 합니다.

http://www.patent.go.kr/jsp/kiponet/ir/receipt/online/applNoOffcAct.so 2017-11-30

국가연구개발 보고서원문 성과물 전담기관인 한국과학기술정보연구원에서 가공·서비스 하는 연구보고서는 동의 없이 상업적 및 기타 영리목적으로 사용할 수 없습니다

[별첨2]

〈 세부 목표 관련 증빙 〉



2017년 대한의용생체공학회
추계학술대회

of nanoarchitecture-dependent stem cell-nanotopographical feature interactions is reported using the 3D printed scaffold covered with the highly transparent and flexible multi-walled carbon nanotubes (MWCNTs) and polyurethane (PU) composite mats in the form of customizable patterned nanostructures. The topographical feature of a 3D printed scaffold is an efficient tool that induces the osteogenic differentiation and replaces the use of bioactive cues. Furthermore, MWCNT networks in nanofibrous substrates provide contact guidance cues for the regulation of physiologically relevant bone marrow stem cells (BMSCs) and inducing the improved osteogenic differentiation. As a plausible explanation for the improved osteogenesis of BMSCs in the 3D printed scaffold modified by customizable patterned MWCNT composite nanofibers, we proposed in vitro and in vivo evaluation. We expect knowledge gained from this work of nanoarchitecture-stem cell interaction to enhance osteogenesis and develop of next generation of stem cell culture with 3D printed matrix. Also, we suggest the 3D scaffold with customizable nanopatterns can be a suitable substitute for the stem cell therapeutics for the bone regeneration.

P-057

혈액적합성 및 생체적합성 성질을 가진 생체막 유사 의료용 코팅제의 합성 및 평가

김자선[1,2], 홍소영[1], 황창모[1,2]

[1]서울아산병원 아산생명과학연구원 의공학연구소
[2]울산대학교 의과대학 대학원 의공학전공

In order to inhibit protein adsorption and platelet adhesion on the surface, which is necessarily caused when a polymer is used as a coating agent in blood-contact medical device, a polymer having a structure similar to a biomembrane is synthesized and coated on the surface. we confirmed that the surface was coated thought scratch test. We confirmed the coating with the highest ratio of silane group was the thinnest coating. In vivo study demonstrates that the thickness of the fibrous capsule of experimental group was much thinner than that of the control.

P-058

연골세포 증식을 위한 펄스형 전자기장 자극의 매개 변수 효과

김대형[1], 천송이[1], 이민우[2], 도대국[2], 서솔아[2], 문치용[2]

[1]양산부산대학교병원 의생명융합연구소
[2]인제대학교 의용공학부

Electromagnetic fields (EMF) are widely used in the medical field. However, the conditions are not optimized for each research device. Therefore, in this study, as chondrocyte proliferation are exposed by pulsed electromagnetic field (PEMF) in various conditions, we investigate optimized PEMF parameters and suggest for helping cartilage treatment and recovery.

P-059

골모세포 분화 연구를 위한 기계적 자극기의 개발

신교원, 노정훈

부산대학교 의과대학 의공학교실

A reliable and economic mechanical stimulator for the biological pathway research of osteoblast differentiation was developed. A Shikata style stimulator has been constructed using the easily available parts and Arduino board. The exciter is combined with a 3D printed plate holder and two woofer speakers. AD9833 is used for the signal generator, and a digital accelerometer ADXL345 is attached on the vibrating plate for closed loop control of acceleration. The frequency range of the developed system is 25–100 Hz, max acceleration stimulation is 3 G. The acceleration feedback control make it stable along experimental period. The frequency stability is that of quartz crystal, and acceleration deviation is less than 0.02 G.

107

국가연구개발 보고서원문 성과물 전담기관인 한국과학기술정보연구원에서 가공·서비스 하는 연구보고서는 동의 없이 상업적 및 기타 영리목적으로 사용할 수 없습니다

연골세포 증식을 위한 펄스형 전자기장 자극의 매개 변수 효과

김태형[1], 천승이**[2], 이민우[2], 도대국[2], 서솔아[2], 문치웅[2]*
[1]양산부산대학교병원 의생명융합연구소
[2]인제대학교 의용공학부

Parameter effects of pulsed electromagnetic field (PEMF) stimulation for chondrocyte proliferation

T. H. Kim[1], S. I. Chun**[2], M. W. Lee[2], D. G. Do[2], S. A. Seo[2]and C.W. Mun[2]*
[1]Research Institute for Convergence of Biomedical Science and Technology, Pusan National University Yangsan Hospital, Yangsan, Korea
[2]Department of Biomedical Engineering/uHARC, Inje University, Gimhae, South Korea
*mcw@inje.ac.kr

Abstract

Electromagnetic fields (EMF) are widely used in the medical field. However, the conditions are not optimized for each research device. Therefore, in this study, as chondrocyte proliferation are exposed by pulsed electromagnetic field (PEMF) in various conditions, we investigate optimized PEMF parameters and suggest for helping cartilage treatment and recovery.

연구 배경

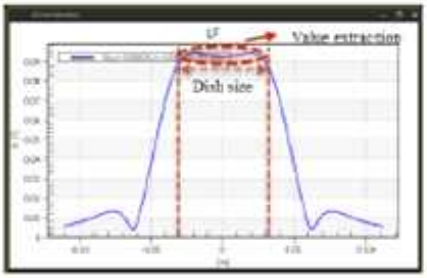
전자기장은 표면 연부조직의 통증부터 부종에 대한 자기장 자극과 같은 치료에 적용되는 장치까지 매우 다양한 방법으로 사용되고 있다 [1]. 하지만 치료에 적용되는 조건들이 연구나 연구 장치마다 달라 최적화 되어있지 않다 [2]. 따라서 이러한 한계점을 극복하기 위해 공학적이고 정량적인 검증이 필요하다. 연골세포 증식에 영향을 미치는 PEMF 자극기의 매개 변수를 확인함으로써 연골 치료 및 회복 장치의 성능을 향상시킬 수 있을 것으로 기대된다. 본 연구에서는 PEMF 자극 조건에 따라 연골 세포 증식의 변화를 확인하여 가장 큰 영향을 주는 자극 조건을 찾고자 한다.

연구 방법

연골세포는 약 1.2kg의 생후 6주가 지난 New Zealand White Rabbit의 대퇴골과 경골로부터 추출 후 4-well plate에서 자극 실험이 진행되었다. 4-well plate의 각 well에 균일한 PEMF를 인가하기 위해 코일 디자인을 Sim4Life (ZMT, Zurich, Switzerland) 소프트웨어를 통해 사전 시뮬레이션을 진행하였다. 이 시뮬레이션 결과를 바탕으로 디스크 형태의 코일 한 쌍을 제작하여 PEMF를 발생시켰다. 그림 1은 시뮬레이션 시 디자인된 코일과 세포 자극 위치에서의 자기장 균일도를 보여주고 있다. 시뮬레이션을 바탕으로 PEMF 자극기를 제작한 뒤 표 1과 같은 자극 프로토콜로 실험을 진행하였다. 이전 연구와는 달리 [3] 자극 시간을 60분으로 고정하고 자극 주파수는 1Hz / 10Hz, 자기장 세기는 0.3T / 0.5T / 0.7T로 7

국가연구개발 보고서원문 성과물 전담기관인 한국과학기술정보연구원에서 가공·서비스 하는 연구보고서는 동의 없이 상업적 및 기타 영리목적으로 사용할 수 없습니다

일간 자극을 가하였다. 본 실험에서 대조 군은 인큐베이터에 7일간 두었고 자극 실험이 끝나면 MTT assay로 흡광도를 측정하여 연골세포 증식을 정량 분석하였다. 통계적 검증으로 유의한 차이를 확인하기 위해 SPSS (version23, Chicago, IL, USA)를 이용하여 독립 두 표본 t-검증을 실시하여 유의수준 $p<0.01$로 검증하였다.



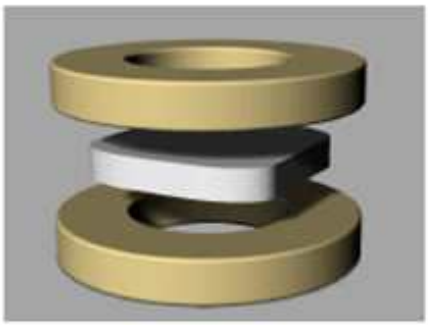


그림 1. 디자인된 코일과 자극 위치에서의 자기장 균일도

Frequency (Hz)	1	10
Time (min)	60	60
PEMF strength (T)	0.6	0.6
	0.6	0.6
	0.7	0.7

표 1. 자기장 자극의 주파수와 자기장 세기의 변화 프로토콜

연구 결과

그림 2는 주파수와 자기장 세기의 변화에 따른 연골세포 증식의 MTT assay 결과를 나타낸 것이다. 0.3 T / 10Hz / 60min, 0.7 T / 10Hz / 60 min 자극을 받은 연골세포와 대조군간의 차이는 유의 수준 0.01 미만으로 차이가 났다. 하지만 대조 군과 비교하여 0.3 T / 10Hz / 60 min 의 자극은 대조 군에 비해 연골세포 증식률이 증가하는 긍정적인 조건임을 확인하였고 반대로 0.7 T / 10Hz / 60 min 자극은 대조 군에 비해 증식률이 감소하여 연골세포 증식을 억제하는 것으로 확인하였다.

본 연구의 결과는 자기장 자극의 조건에 따라 세포 증식효과가 다름을 보여 주었다. 따라서 생체 조직에 대한 자기장 자극도 목적에 따라 자극 최적 조건을 찾아 적용시켜야 할 것으로 생각된다.

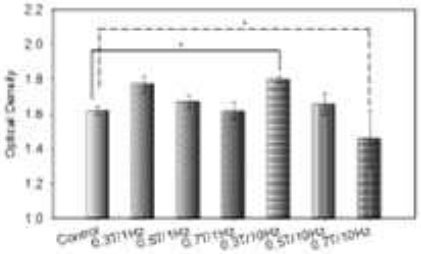


그림 2. MTT assay 통계 결과 (독립 두 표본 t-검증, *$p < 0.01$)

Acknowledgements

이 연구는 2014년도 정부(미래창조과학부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 기초연구사업임(No.NRF-2014R1A2A1A11053868)

국가연구개발 보고서원문 성과물 전담기관인 한국과학기술정보연구원에서 가공·서비스 하는 연구보고서는 동의 없이 상업적 및 기타 영리목적으로 사용할 수 없습니다

P-120

ECM을 질량체로 갖는 가속도 센서로 구성된 하이브리드 방식의 이식형 음향센서 구현

문하준[1], 신동호[1], 성기웅[2], S. Puria[3], H.H.Nakajima[3], 조진호[1]

[1]경북대학교 IT대학 전자공학부
[2]경북대학교 병원 의공학과
[3]하버드 의과대학

To develop a high performance implantable microphone, a hybrid acoustic sensor which combines a vibration based acceleration sensor and a sound pressure based acoustic sensor electret condenser microphone (ECM) is proposed. This sensor presents a good low frequency sensitivity of an ECM and also a good high frequency sensitivity of an acceleration sensor so that it gives a wide frequency response with improved microphone gain. The vibration beam of the capacitive acceleration sensor was designed through the finite element analysis and the polyimide flexible PCB was fabricated based on the analysis results. And the frequency characteristics of the vibration beam and the developed implantable microphone was measured using vibration exciter and standard microphone. In addition, we confirmed the feasibility of the hybrid implantable acoustic sensor through cadaveric experiment.

P-121

발바닥 부위 쿨링이 심부 체온에 미치는 효과

박유진[1], 김정훈[2], 박지은[1], 이충민[1,3]

[1]경북대학교 대학원 의용생체공학과
[2]경북대학교 대학원 전자공학과
[3]경북대학교 의학전문대학원 영상의학교실

In this study, we investigated the effect of foot cooling on the reduction of body temperature after hard exercise at the high temperature of 40℃. We produced the cooling device to cool the foot using Peltier module. The results of deep body temperature measurement showed average 38.78 ± 0.22℃ to 38.54 ± 0.15℃ when the normal recovery method was performed. Cooling recovery method on one foot showed average 38.69±0.14 ℃ to average 38.06±0.17℃ and Cooling recovery method on both feet showed average 38.69±0.15℃ to average 37.84±0.21℃.

P-122

핵자기공명분광법 Locking 물질의 세포 독성에 관한 연구: D_2O와 DMSO-D_6

천송이[1], 서솔아[1], 김태형[2], 이민우[1], 도대국[1], 문치웅[1,3]

[1]인제대학교 의용공학부
[2]상산부산대학교병원 의생명융합연구소
[3]인제대학교 u-항노화헬스케어연구소

The purpose of this study is to evaluate the cytotoxicity of NMR locking solvents, D_2O and DMSO-D_6, under various concentration and exposure time. MG-63 cell line was chosen and cultured in medium with various concentrations of solvent including 1mM TSP. And cell viabilities were measured at 1-2-3-6-12-24h after locking solvent exposure. Authors found that cell viability were no significant differences in lower 20% concentration of DMSO-D_6 and within 2-hour exposure time. This study showed the possibility of candidate agents for NMR locking solvents, in which low concentrations of DMSO-D_6 can be used for non-invasive/non-destructive measurements of cells and tissues.

P-123

Use of Superelastic Nitinol for Temporary Occlusion of the Esophagus

Yanfei Chen[1], Philip Carullo[2], and Youngjae Chun[1,3]

[1]Department of Industrial Engineering, University of Pittsburgh
[2]Department of Anesthesiology, University of Pittsburgh School of Medicine
[3]Department of Bioengineering, University of Pittsburgh

국가연구개발 보고서원문 성과물 전담기관인 한국과학기술정보연구원에서 가공·서비스 하는 연구보고서는 동의 없이 상업적 및 기타 영리목적으로 사용할 수 없습니다

핵자기공명분광법 Locking 물질의 세포 독성에 관한 연구: D_2O 와 DMSO-D_6

천승이[1], 서솔아[1], 김태형[2], 이민우[1], 도대국[1], 문치웅[1,3,*]
[1]인제대학교 의용공학부, [2]양산부산대학교병원 의생명융합연구소, [3]인제대학교 u-헬스케어연구소

Cytotoxicity of Nuclear Magnetic Resonance Locking solvent: D_2O and DMSO-D_6

S.I. Chun[1], S. A. Seo[1], T.H. Kim[2], M. W. Lee[1], D. G. Do[1], C.W. Mun[1,3,*]
[1]Department of Biomedical Engineering, Inje University, Gimhae, Gyeongnam, South Korea, [2]Research Institute for Convergence of Biomedical Science and Technology, Pusan National University Yangsan Hospital, Yangsan, South Korea, [3]u-HARC, Inje University, Gimhae, Gyeongnam, South Korea
*mew@inje.ac.kr

Abstract

The purpose of this study is to evaluate the cytotoxicity of NMR locking solvents, D_2O and DMSO-D_6, under various concentration and exposure time. MG-63 cell line was chosen and cultured in medium with various concentrations of solvent including 1mM TSP. And cell viabilities were measured at 1-2-3-6-12-24h after locking solvent exposure. Authors found that cell viability were no significant differences in lower 20% concentration of DMSO-D_6 and within 2-hour exposure time. This study showed the possibility of candidate agents for NMR locking solvents, in which low concentrations of DMSO-D_6 can be used for non-invasive/non-destructive measurements of cells and tissues.

연구 배경

기존의 세포 연구 분석 방법들은 복잡한 연구 단계를 거친 뿐만 아니라 시편의 일회성 사용으로 인해 비침습적/비파괴적 분석법의 요구가 점점 커지고 있다. 본 연구팀은 생체 조직 및 세포의 비침습적/비파괴적인 분석에 핵자기공명분광 (Nuclear Magnetic Resonance: NMR)의 적용 및NMR 측정 시 사용되는 용매들의 독성 연구도 진행하고 있다. NMR locking 용매인 D_2O의 경우 세포에 24시간 이상 노출시키면 50% 이하의 세포 생존율을 나타내며[1], 기준 물질로 사용되는 TSP의 경우 10 mM 이상의 농도에서 세포 독성이 나타나는 것으로 알려져 있다[2]. 이 때문에 지금까지의 NMR 측정법은 한 번 측정한 세포 시료를 다시 배양하지 못하고 다른 분석법에 사용하거나 폐기해왔다. 본 연구진은 생체 조직 및 세포의 비침습적/비파괴적 분석법에 적합한 NMR 용매와 노출 시간 찾고자 하였다. 따라서 본 연구에서는, NMR locking 용매인 Deuterium water (D_2O)와 Hexadeutero-dimethyl sulfoxide (DMSO-D_6)에 기준 물질인 TSP을 첨가한 후 농도와 노출 시간에 따른 세포독성을 확인하고자 하였다.

연구 방법

두 Locking 용매의 세포 독성을 알아보기 위한 대상 세포로 MG-86 (human osteosarcoma cell line)을 선택하였다. 세포는

국가연구개발 보고서원문 성과물 전담기관인 한국과학기술정보연구원에서 가공·서비스 하는 연구보고서는 동의 없이 상업적 및 기타 영리목적으로 사용할 수 없습니다

$1x10^4$cells/ml의 농도로 파종하였으며, DMEM-HG (1% antibiotic, 10% FBS)를 이용하여 배양하였다. D_2O와 DMSO-D_6에 대한 독성을 보기 위해 표 1과 같이 대조군과 실험군을 설정하였다. 표 1에서 두 용매의 실험 농도가 다른 이유는 NMR 측정에서 Locking이 가능한 최소 농도 범위를 사전에 측정한 값으로 선택했기 때문이다. 대조군 배양액은 세포 배양액인 DMEM-HG로 설정하였고, 실험군 배양액은 D_2O saline (0.9% NaCl, 99.9% Deuterium water)과 DMSO-D_6 saline을 생리식염수 (0.9% NaCl)와 농도별로 희석하여 준비하였다. 이때 배양액이 아닌 생리식염수와 섞은 이유는 NMR 측정 시 스펙트럼에 간섭이 일어날 수 있는 용액을 최소화하기 위해서이다. 모든 실험군에는 1mM TSP를 기준 물질로 첨가하였다. 파종 24시간 후 기존의 세포 배양액을 모두 제거하고 생리식염수로 2회 세척 후 대조군 배양액과 실험군 배양용액에서 각각 배양하였다. 각 배양용액에서의 대상 용매 노출 시간에 따른 세포 생존율 비교를 위해 배양 시간을 1, 2, 3, 6, 12, 24 시간으로 지정하였다. 배양 시간이 지난 후 세포생존율은 MTT assay로 흡광도를 측정하고 각 실험 조건에 대한 대조군의 흡광도 값을 기준으로 백분율로 정규화 하여 세포 생존율을 계산하였다. SPSS를 사용하여 세포 생존율에 대하여 One-way ANOVA test를 수행하였으며, 사후검정으로는 대조군에 대한 검증이 가능한 Dunnet t-검정 방법을 적용하였다(α=0.05).

연구 결과

D_2O와 DMSO-D_6의 농도와 노출시간에 따른 세포 생존율을 표 2와 3에 나타내었다.

먼저 D_2O 농도에 따른 세포 생존율을 살펴보면 대조군에 비하여 모든 농도와 노출시간에서 유의하게 낮은 생존율을 보이는 것을 확인할 수 있다 (표 2). 반면 DMSO-D_6의 농도가 높을수록 세포 생존율이 낮아지지만 6, 10% 그룹의 1, 2시간 노출 조건에서는 대조군의 생존률과 비교했을 때 통계적으로 유의한 차이가 ($p<0.05$) 나타나지 않았다(표 3). 다른 그룹에서는 2시간 노출을 제외하고는 모두 유의한 수준의 세포독성을 확인했으며, 2시간 노출 시간의 경우 DMSO-D_6 20% 농도 범위까지 대조군에 비하여 세포가 성장한 것을 확인할 수 있었다. 이는 일반 DMSO의 세포 독성을 확인한 연구결과와 같은 양상을 나타내는 것을 확인할 수 있었다. [8]

본 연구에서는 NMR locking 물질인 D_2O와 DMSO-D_6의 세포 독성에 관하여 확인하였으며, 이중 DMSO는 20% 농도 내에서 2시간 이내의 노출에는 세포 독성이 통계적으로 무시할 수 있음을 확인할 수 있었다. 따라서 본 연구에서 제시하는 20% 이내 DMSO-D_6와 1 mM TSP 조건에서 NMR 측정을 2시간 이내로 수행한다면, 세포 시료의 재사용이 가능한, 즉, 동일한 시료를 계속 배양하며 연속적이고 반복적인 NMR 측정이 가능할 것으로 생각된다. 또한 연속적인 NMR 세포 측정이 가능하게 된다면 측정 시편이 달라지는 데서 나타나는 측정 오류를 줄일 수 있어서 재현성 향상 및 실험 비용 절감을 기대할 수 있을 것이다.

Acknowledgements

이 연구는 2014년도 정부(미래창조과학부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 기초연구사업임(No.NRF-2014R1A2A1A11053868)

표1. NMR Locking 용매 실험군 분류

	D_2O	DMSO-D_6
대조군	100% 배양액	
실험군	60%	60%
	40%	40%
	30%	30%
	20%	20%
	10%	15%
	-	10%
	-	6%

국가연구개발 보고서원문 성과물 전담기관인 한국과학기술정보연구원에서 가공·서비스 하는 연구보고서는 동의 없이 상업적 및 기타 영리목적으로 사용할 수 없습니다

< 2016년도 BMES >

Thursday, October 6 | 9:30 am–5:00 pm | Poster Session | Exhibit Hall BC

Poster Viewing with Authors & Refreshment Break | 9:30 am–10:15 am and 2:30 pm–3:15 pm

Th-568
Evaluation of Pulsed Electromagnetic Field Exposure System for Chondrocyte Proliferation
Song-I Chun[1], Tae hyung Kim[1], and Chi-woong Mun[1]
[1]*Inje University, Gimhae, Korea, Republic of*

Track: Tissue Engineering
Clinical Translation of Engineered Tissues

Th-569
Non-invasive Assessments to Track Human White Adipose Tissue Engineered Models *In Vitro*
Rosalyn Abbott[1], Carlo Alonzo[1], Francis Borowsky[1], Irene Georgakoudi[1], and David Kaplan[1]
[1]*Tufts University, Medford, MA*

Track: Tissue Engineering
Engineering Replacement Tissues

Th-570
Negative Pressure Enhances Cellular Infiltration into Electrospun Fibrous Scaffolds
Azadeh Tirnak[1,2], Jonathan A. Gerstenhaber[1,2], Yah-el Har-el[1,2], and Peter I. Lelkes[1,2]
[1]*Department of Bioengineering, College of Engineering, Temple University, Philadelphia, PA,* [2]*Temple Institute for Regenerative Medicine and Engineering (TIME), Temple University, Philadelphia, PA*

Th-571
The Effects of Hypoxic Cell Expansion and Tissue Culture on Auricular Cartilage Engineering
Benjamin Cohen[1] and Lawrence Bonassar[1]
[1]*Cornell University, Ithaca, NY*

Th-572
Blow-spun Chitosan/PEG/PLGA Nanofibers as a Novel Tissue Engineering Scaffold
Diane Bienek[1] and Wojtek Tutak[1]
[1]*ADA Foundation, Gaithersburg, MD*

Th-573
Contributions of BMP Proteins in Cardiac Repair Cell functionality and Angiogenesis in a 3D in vitro Model
Isabella Pallotta[1], Bruce Sun[1], Gregory Lallos[1], Cecile Terrenoire[1], and Donald Freytes[1,2,3]
[1]*The New York Stem Cell Foundation Research Institute, New York, NY,* [2]*North Carolina State University, Raleigh, NC,* [3]*University of North Carolina-Chapel Hill, Chapel Hill, NC*

Th-574
Development of a Bio-inspired Hybrid Nanosack for Islet Transplantation in the Omentum
Patrick Hwang[1], Dong-Jin Lim[1], Grant Alexander[1], Anath Shalev[1], Wanxing Cui[2], Shawn Gilbert[1], and Ho-Wook Jun[1]
[1]*University of Alabama at Birmingham, Birmingham, AL,* [2]*Medstar Georgetown Hospital, Washington, DC*

Th-575
Tissue Engineered Cartilaginous Trachea Using Chondrocyte-Seeded Polymer Scaffolds
Timothy Holzberg[1], Ting Guo[1], Joshua Bedwell[2], Diego Preciado[2], George Zalzal[2], and John Fisher[1]
[1]*University of Maryland, College Park, MD,* [2]*Children's National Medical Center, Washington, DC*

Tracks: Nano and Micro Technologies, Tissue Engineering
Human and Organ on a Chip

Th-576
A Soft Microfluidic Device as an In Vitro Model for Studying Mechanobiology of Tubular Organs
Hyeonji Yu[1], Dongwon Kang[1], Kwangin Shin[1], Minji Whang[1], and Jungwook Kim[1]
[1]*Sogang University, Seoul, Korea, Republic of*

Th-577
Cell-Matrix and Cell-Cell Interactions in Endothelial Barrier Models on Porous Glass Membranes
Stephanie Casillo[1], Ana Peredo[1], Andrea Mazzocchi[1], and Thomas Gaborski[1]
[1]*Rochester Institute of Technology, Rochester, NY*

Th-578
Novel Mechanisms of Non-Coding Genomic Regulation Identified in Cardiac Disease-in-a-dish Models
Aditya Kumar[1], Stephanie Thomas[1], Kirsten Wong[1], Kevin Tenerelli[1], Valentina Lo Sardo[2], William Ferguson[2], Eric Topol[2,3], Kristin Baldwin[2], and Adam Engler[1,4]
[1]*University of California, San Diego, La Jolla, CA,* [2]*The Scripps Research Institute, San Diego, CA,* [3]*Scripps Translational Science Institute, La Jolla, CA,* 4*Sanford Consortium for Regenerative Medicine, San Diego, CA*

Th-579
Co-patterning of Living Tissues In 3D-Printed Microfluidic Chips
Christiane Nguyen[1], Stephanie Knowlton[2], Chu Hsiang Yu[2], and Savas Tasoglu[2]
[1]*University of Connecticut, Danbury, CT,* [2]*University of Connecticut, Storrs, CT*

Th-580
Human Colon Biopsy Slices Ex Vivo: Impacts of Oxygen and Bacteria
Luke Schwerdtfeger[1], Erica Borresen[1], Elizabeth Ryan[1], and Stuart Tobet[1]
[1]*Colorado State University, Fort Collins, CO*

Th-581
Effect of Gelatin Patterning and Stiffness on the Culture of Podocytes for Glomerulus-on-a-chip
Ellery Jones[1], Matthew Ishahak[1], Alla Mitrofanova[2], Alessia Fornoni[2], and Ashutosh Agarwal[1]
[1]*University of Miami, Coral Gables, FL,* [2]*University of Miami, Miami, FL*

Th-582
Endogenous Signals Shape Phenotype of Primary Hepatocytes Cultured in Microchambers
Pantea Gheibi[1], Amranul Haque[1], Yandong Gao[1], Elena Foster[1], Kyung Jin Son[1], Jungmok You[1], Gulnaz Stybayeva[1], Dipali Patel[1], and Alexander Revzin[1]
[1]*University of California, Davis, Davis, CA*

Th-583
A Tissue Engineered Model of Aging
Aylin Acun[1], Dervis Vural[1], and Pinar Zorlutuna[1]
[1]*University of Notre Dame, Notre Dame, IN*

Th-584
Design and Development Of An In Vitro Vascular Model Using 3D Printing-enabled Hydrogel Casting Technique
Pranav Soman[1], Liang Yang[1], Shivkumar Shridhar[1], and Melissa Gerwitz[1]
[1]*Syracuse University, Syracuse, NY*

Th-585
Vessel Growth Response to Controlled Oxygen Gradients in a Microfluidic Platform
Sandra Lam[1], Yunli Chu[1], Alan Soetikno[1], and Steven George[1]
[1]*Washington University in St. Louis, St. Louis, MO*

국가연구개발 보고서원문 성과물 전담기관인 한국과학기술정보연구원에서 가공·서비스 하는 연구보고서는 동의 없이 상업적 및 기타 영리목적으로 사용할 수 없습니다

< 2016년도 BMES >

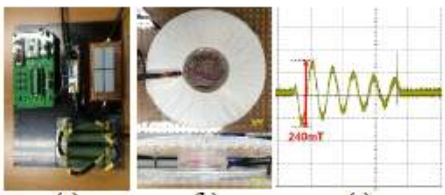
Evaluation of pulsed electromagnetic field exposure system for chondrocyte proliferation

Song-I Chun*, Tae Hyung Kim**, Chi Woong Mun* **
School of Biomedical Engineering/u-HARC*, Health Science & Technology**, Inje University, Korea.

Introduction: Recently, several investigators have found that magnetic field therapy provides a non-invasive, safe, and easy method to relieve pain in musculoskeletal disorders. The most efficient application of the magnetic field therapy is to try osteosynthesis, pain relief, and reduction of soft tissue edema. Further for many musculoskeletal injuries and post-surgical, post-traumatic and chronic wounds, magnetic field therapy has been recognized as a modality that contributes to reduction of edema [1]. Edema reduction can be a major therapeutic factor in acceleration of pain relief which in turn contribute toward the healing process. Several investigations the magnetic field suggest that it will gain speed of the healing process. Also it is known to promote the fundamental functions, such as nerve regeneration, immunopotentiation, endocrine function [2]. However, the method using a specific PEMF waveform and amplitude have usually been used a variety of devices by a method using a low-frequency magnetic field, it is difficult to compare and analyze the biological and clinical effects. In this study, we evaluated lab-developed PEMP exposure system for chondrocyte proliferation using.

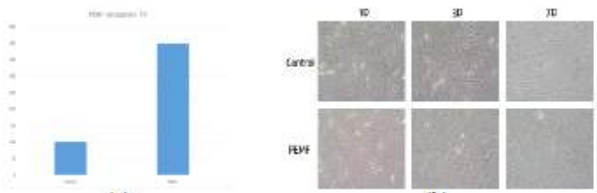
Materials and Methods: Cell stimulation probe was designed to apply uniform magnetic fields to the cell specimen in 4-well plate or 60mm culture dish. Computer simulation was performed to minimize the size of Helmholtz coil by using Biot-Savart rule of Sim4Life (ZMT, Zurich, Switzerland) software package whose magnetic fields can be analyzed by the Maxwell's equation. MG-63 cells, $1x10^4$ cells/ml, were seeded at 4-well plate. The cells were then cultured with DMEM-HG medium containing 10% FBS and 1% P/S. After 24h of cell seeded, the cells were placed in lab produced PEMF exposure system, and the all wells in the plate were exposed at 240mT/1hour/1day. The experiment repeated 7days, the medium was changed every day. MTT assay was chosen to measure cell proliferation. Optical density was measured by solubilized cells in 96-well plate using ELISA reader of 595nm wavelength. Cell proliferation values were normalized by optical density of control groups at each experimental condition and expressed by percentage.

Results and Discussion: The applied strength of PEMF exposure system to cell specimen (Fig 1.(a),(b)) was 240mT (Fig 1.(c)). Improvement of chondrocyte proliferation caused by the PEMF stimulation was confirmed that about 4-folds compared with control group (Fig 2).



(a) (b) (c)

Fig 1. (a) Lab produced PEMF system, (b) Cell stimulation probe, (c) Output waveform



(a) (b)

Fig 2. (a) Graph of chondrocyte proliferation (7days), (b) Morphology of chondrocyte compared with control & PEMF

Conclusions: In this study, it was found that proliferation of bone cells exposure to PEMF was improved compared with control cells during 7day culture period. From this results, authors believe that the cell proliferation on chondrocyte are mainly induced by PEMF exposure.

Acknowledgements: This research was supported by Basic Science Research Program through the National Research Foundation of Korea(NRF) funded by the Ministry of Science, ICT & Future Planning (NRF-2014R1A2A1A11053868, http://www.nrf.re.kr)

References: [1] M. MARKOV, Pulsed electromagnetic field therapy history, state of the art and future. Environmentalist, 2007. 27:465-475
[2] M. MARKOV, Magnetic Field Therapy: A Review, Electromagnetic Biology and Medicine, 2007.26:1-23

국가연구개발 보고서원문 성과물 전담기관인 한국과학기술정보연구원에서 가공·서비스 하는 연구보고서는 동의 없이 상업적 및 기타 영리목적으로 사용할 수 없습니다

세포자극 용 균일펄스전자기장 발생 장치 개발

김태형[1], 전상이[2], 김동혁[2] 문치웅[2]
인제대학교 융합의과학과[1], 인제대학교 의용공학부, u-HARC[2]

Development of Pulsed Electromagnetic Field (PEMF) exposure system for cell stimulation on homogenous magnetic field

T.H.Kim[1*], S.I.Chun[2], D.H.Kim[2], C.W.Mun[2]
Department of Health Science & Technology, Inje University, Gimhae, Korea[1]
School of Biomedical Engineering, u-HARC, Inje University, Gimhae, Korea[2]
*thkim1981@gmail.com

Abstract

In this study, the intensity of magnetic fields and stimulus period with a stimulus were modulated, and PEMP exposure system applying uniform magnetic fields to the stimulus range was developed for quantitative access. The probe for cell stimulation should be developed to generate uniform magnetic fields in the cell specimen. For checking the distribution characteristics of magnetic fields, computer simulation was conducted. The PEMF exposure system was designed to control both duty ratio from 1 to 100% in the frequency range of 1~100Hz and magnetic field output from 100 to 400mT.

연구 배경

자기장이 인체 내에서 작용하는 메커니즘을 알아내기 위한 연구는 오랫동안 이루어져왔다. 특히 자기장치료는 부상이나 통증과 염증의 원인에 대해 비침습적이고, 안전하며 쉬운 방법을 제공해주는 것으로 알려져 있다[1]. 자기장 치료의 가장 효율적인 적용 분야는 뼈 결합, 통증 완화, 연부조직 부종이라 할 수 있으며, 근골격계 손상, 수술 후 상처, 외상 후 상처, 그리고 만성 상처에 있어서 자기장은 부종 감소를 시킬 수 있는 요법으로 인식되고 있다. 부종 감소는 통증을 완화시키는 치유 과정에 기여하는 중요한 치료 요소라고 할 수 있다. 또한 자기장은 신경 치유와 재생, 면역 기능, 내분비 기능과 같은 근본적인 기능도 증진시키는 것으로 알려져 있다[2,3]. 하지만 펄스전자기장(PEMF) 치료 방법은 특정 파형과 진폭을 이용하며 보통 저주파 자기장을 이용하는 방법이다. 펄스전자기장 치료법을 적용한 다양한 장비들이 이용되고 있으나 생물학적, 임상학적 효과들을 정량적으로 비교하고 분석하는데 어려움이 있다. 또한 최근에는 이러한 펄스전자기장 치료법들을 세포 수준에 적용시켜 치료 메커니즘을 알아내기 위한 연구가 활발히 이루어지고 있으나 장치가 세포에 사용될 때 사용되는 자기장의 균일성에 대한 평가는 이루어지지 않고 있으며, 장치가 세포에 사용될 때 미치는 영향에 대한 정량적 접근이 어려운 실정이다.

본 연구에서는 컴퓨터 모의실험으로 균일한 자장 인가를 위하여 자기장 발생부의 성능을

국가연구개발 보고서원문 성과물 전담기관인 한국과학기술정보연구원에서 가공·서비스 하는 연구보고서는 동의 없이 상업적 및 기타 영리목적으로 사용할 수 없습니다

연구 결과

컴퓨터 모의실험의 결과로 추출한 내부 반지름(R_{in}), 원형코일 사이의 거리(D), 코일의 권선수(N)는 각각 85 mm, 80 mm, 25 일 때 시료가 위치한 영역에서 균일한 자장을 형성하는 것을 확인하였다. (그림 1) 모의실험의 결과로 산출한 값을 이용하여 제작된 코일을 그림에 나타내었으며 이를 이용하여 제작한 펄스전자기장 발생 장치를 나타내었다. 본 장치에서 발생되는 자기장의 출력을 확인한 결과 100 mT ~ 400 mT의 범위에 있음을 확인하였다. (그림 2) 제작한 장치를 이용하여 연골세포를 자극한 결과는 아래 그래프에 나타내었다. 자극을 가한 후 8일째 되는 날 MTT assay를 시행하여 대조군인 연골세포와 펄스전자기장 자극 연골세포의 증식률을 확인하였다. 그 결과 자극이 가해진 연골세포가 대조군에 비하여 약 4배 가량 더 증식하였음을 확인 하였다. (그림 3)

Acknowledgements

이 논문은 2014년도 정부(미래창조과학부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 기초연구사업임(NRF-2014R1A2A1A11053868).

참고 문헌

[1] M. MARKOV, *Magnetic Field Therapy: A Review*, Electromagnetic Biology and Medicine, Vol.26, pp1-28, 2007.

[2] M. MARKOV, *Pulsed electromagnetic field therapy history, state of the art and future*, Environmentalist, Vol.27, pp465-475, 2007.

[3] A. Colbert et al., *Static Magnetic Field Therapy: A Critical Review of Treatment Parameters*, eCAM, Vol.6(2), pp133-139, 2009