



이 학 석 사 학 위 논 문

# 카드뮴-아스코르빈산의 혼합사료 급이에 따른 강도다리, Platichthys stella의 독성 및 해독효과



2019년 8월

부경대학교대학원

수산생명의학과

원 태 준

이 학 석 사 학 위 논 문

# 카드뮴-아스코르빈산의 혼합사료 급이에 따른 강도다리, Platichthys stella의 독성 및 해독효과



2019년 8월

부경대학교대학원

수산생명의학과

원 태 준

# 원태준의 이학석사 학위논문을 인준함

2019년 8월 23일



위 원	장	이학박사	김 기 홍	
위	원	이학박사	정 준 기	(인)
위	원	이학박사	강 주 찬	

목차
Abstract iii
I.서 론 ···································
Ⅱ. 재료 및 방법
1. 실험어 및 실험환경
2. 사료성분 및 배합
3. Bioaccumulation 13
4. Growth performance 14
5. 혈액학적 분석
6. 항산화효소 분석
6-1. Superoxide dismutase (SOD)
6-2 Catalage (CAT) $17$
6-3. Glutathione S-transferase (GST)
6-4. Glutathione (GSH) 18
7. 유의성 검정
Ⅲ.결과
1. Bioaccumulation 20
2. Growth performance
3. 혈액학적 분석
4. 항산화효소 분석
4-1. Superoxide dismutase (SOD)

목 차

4-2. Catalase (CAT) ------ 35

4-3. Glutathione S-transferase (GST)	37
4-4. Glutathione (GSH)	39
Ⅳ.고 찰	41
요 약	52
참고문헌	53
OXYA BELOW IN FREE THE STATE	

## Toxicity and detoxification by combination exposure of cadmium and ascorbic acid in starry flounder, *Platichthys stella*

WON TAE JUN

Department of Aquatic Life Medicine, The Graduate School, Pukyong National University

#### Abstract

In oder to determine the detoxification effect of Vitamin C derivative, L-Ascorbyl-2-monophospate(AMP), Starry flounder, Platichthys stellatus (mean length 19.87±0.21 cm, and mean weight 139.47±1.41 g) were exposed for 4 weeks with the different levels of dietary cadmium at 0, 40, 80 mg/kg and 240 mg/L and L-Ascorbyl-2-monophospate at 0, 200, 400, 800 mg/kg. The accumulation of cadmium significantly increased in organs of P. stellatus and the highest accumulation was observed in intestinal tissues. The growth performance of P. stellatus was considerably decreased. In hematological parameters, the RBC count, hematocrit, and hemoglobin were significantly decreased, and the notable alterations in plasma components such as calcium, magnesium, glucose, cholesterol, GOT, and GPT were observed. The dietary Cd exposure affected the hematological parameters and growth performance of P. stellatus, and the high concentration of AMP supplementation was substantially effective to attenuate the toxic effects of the Cd exporsure. In antioxidant, The SOD, CAT, GST activity and GSH level of liver and gill were considerably elevated by the dietary Cd exposure. As a vitamin C derivative, the high levels of AMP supplementation attenuated the increase in the SOD, CAT, GST activity and GSH level.

I. 서 론

현대사회에서 금속은 자연적인 경로 외에 인위적인 경로를 통해 자연에 다수 유입되고 있다. 그 양은 해를 거듭할수록 증가하고 있으며 수중, 퇴적 물 또는 먹이사슬을 통해 수중 생물 내로 축적됨으로써(Olmedo, p at al., 2013) 해양 생태계를 교란시킴과 동시에 인류에게도 위협이 되고 있다 (Lazano et al., 2010). 많은 금속류 중 일부 준금속의 경우 종에 따라 생체 의 구성성분 및 대사과정에서 극미량이 필요하기도 하지만 대부분의 중금 속류는 독성이 매우 심하다(Miliou, H at al., 1998). 이 중 카드뮴은 생체 내에서 강한 독성을 가진 중금속으로써 전기도금 산업과 화학안정제, 안료 생산업에서 주로 사용되며 광업, 금속산업 및 농업을 포함한 인위적 활동 의 부산물로부터 주로 방출된다(Gomez-Mendikute, A., & Cajaraville, M. P., 2003). 전 세계적으로 해양에 유입되는 총 카드뮴의 양은 8000ton/yr에 달하는 것으로 추정되며 낮은 수준의 노출에서도 생체에 악영향을 미친다 (Cope et al., 1994). 어류에 있어서 카드뮴은 생리, 생화학적인 과정에서 세포의 항상성을 변화시켜 DNA damage, membrane depolarization, cytoplasma acidification과 같은 장애를 유발하며(Badisa V. L at al., 2007) 생식장애와 난질의 변화(Lin et al., 2000), 저칼슘혈증 및 척추기형 (Sjobeck et al., 1984)등의 영향을 줌으로써 중추기능의 역할을 방해한다.

중금속에 대한 해양 생물의 위해성 평가는 일반적으로 수중 독성노출에 의한 방법으로 이루어지며 실질적으로 생태계의 급이식 노출에 대한 독성 은 수중 독성노출에 비해 영향이 적다. 그러나 생체 내 카드뮴에 대한 급 이식 독성노출은 수중 독성노출과 유사한 영향을 일으킬 수 있으며(Pratap and Wendelaar Bonga, 1993) 많은 연구 결과에 따르면 급이식 중금속 노

출은 생체 내 위험요소로써 단독으로 작용할 뿐만 아니라 다른 독성물질에 또한 영향을 미칠 수 있다고 알려져 있다(Meyer et al. 2005). 카드뮴의 급 이식 만성 노출은 위장관으로 흡수되어 소화계, 비소화계에 축적되어 영향 을 미치며(Chowdhury et al., 2004) 체내 잔류된 카드뮴은 순환계로 이동 하여 간 및 신장에도 상당한 축적을 발생시킬 수 있다(Harrison and Klaverkamp, 1989). 이러한 체내 중금속 축적은 어류의 방어기작에 영향을 주며 특정 부분에 다량 축적될 경우 체내 삼투압 변화, 이온 불균형 (Mcgeeret at al., 2000)과 같은 생리학적 대사변동 및 기타 스트레스를 발 생시킨다(R. Vinodhini at al., 2008). 따라서 급이식 카드뮴 노출에 따른 해 양생물의 위해성 평가는 수계 환경오염을 판단할 지표로 이용될 수 있다.

성장은 독성물질의 만성노출 영향에 대한 지표로써 사용되는 biomarker 중 하나이다(De Boeck, Vlaeminck & Blust, 1997). 중금속 노출은 어류의 성장지연에 영향을 미친다고 알려져 있으며(Lemaire., 1992) 독성노출로 인 한 체내 항상성 변화는 추가적인 대사가 필요한 보상, 적응과정을 유발시 키고 체내 제한된 에너지원의 재할당을 초래함으로써 성장의 감소로 이어 진다(Beyers et al., 1999). 중금속에 노출된 급이성 물질로 인한 어류의 성 장 감소 사례는 점차 증가하고 있으며, 금속에 노출된 대형 무척추 동물의 서식지에서 이러한 무척추 동물의 상위 포식자에 있는Oncorhynchus mykiss와 Salmo trutta의 성장이 감소한 사례가 보고 된 바 있다 (Woodward et al., 1994; Farag et al., 1999).

혈액학적 성상은 생물의 건강도를 평가하기 위한 biomarker로 활용된다 (Oost et al., 2003; Tavares-Dias et al., 2002). RBC count, hematocrit value, ion concentration, Plasma hormone, glucose와 같은 혈액학적 요소 의 변화는 금속독성에 대한 생리학적 반응을 나타낼 수 있다(Dethloff, Bailey, & Maier, 2001). 금속 노출에 따른 스트레스는 혈액 조성의 변화에

영향을 미치며(Sastry, K.V at al., 1984) 백혈구, 적혈구 및 혈소판과 같은 혈액 내 세포에서의 변화를 유도한다(Carvalho and Fernandes, 2006). 카 드뮴은 적혈구의 미세구조에 영향을 줌으로써 세포막의 변성을 초래하여 hemoglobin의 산소운반 능력에 영향을 미치게 되며(Mojzis and Frantisek, 2000), hematocrit과 hemoglobin 수치의 감소로 인한 빈혈 증상을 유발시 킬 수 있다(Gill and Epple, 1993). 카드뮴은 체내 ion concentration에도 영향을 미치는데, 이온 투과율 변화로 인한 저칼슘혈증이 나타날 수 있으 며(Sjobeck et al., 1984), glutamic oxalate transaminase(GOT), glutamate pyruvate transaminases(GPT)와 같은 핼액 내 효소 또한 카드뮴의 독성영 향에 따라 변할 수 있다. GOT, GPT는 단백질과 탄수화물의 신진대사에 중요한 역할을 하며 이 효소들의 변화는 간, 근육 및 아가미와 같은 다양 한 조직에서 독성물질에 의해 유발된 손상을 진단하는데 사용된다(de la Torre et al., 1999). 따라서 해양생물 혈액 내 여러 구성요소들은 카드뮴 독성을 판단 하는 중요한 biomarker가 될 수 있다.

산소는 산화적 인산화 반응에서 전자의 말단 수용체이기 때문에 호기성 대사에서 필수적인 요소이다. 그러나 카드뮴 노출과 같은 특정 조건에서는 전자의 흐름이 차단되어 과도한 reactive oxygen species (ROS)가 생성 될 수 있다(Novelli et al., 1998). ROS는 산화 스트레스를 유발시켜 생체 내 악영향을 주는 요소이며 전이금속 및 산화·환원 순환화합물을 포함한 xenobiotics 중 일부는 상당한 ROS를 발생 시키는 것으로 알려져 있다 (Kehrer,1993). ROS는 단백질과 DNA의 산화, 세포막의 불포화 지방을 과 산화 시킴으로써 불안정한 lipid hydroperoxide을 생성하게 되고 이 생성물 은 지질과 과산화 연쇄반응의 순환을 지속시키는 자유라디칼로 분해 될 수 있다(Brucka-Jastrzębska, E.,2010).

생물은 ROS로 인한 산화적 손상을 제어하기 위한 메커니즘으로

superoxide dismutase(SOD), catalase(CAT), glutathione peroxidase(GPx), glutathione reductase(GR), glutathione-S-transferase(GST)와 같은 항산 화 효소를 발달시켜 왔다. reduced glutathione(GSH), vitamins C and E와 같은 저분자 항산화제 또한 이러한 항산화 효소와 함께 결합하여 작용함으 로써 산화적 손상을 제어하는 역할을 한다(Pascual, P. at al., 2003). SOD 는 자유라디칼을 H2O2와 O2로 아세틸화 시킴으로써 자유라디칼의 직접적 인 독성을 방어한다. 그리고 자유라디칼이 금속이온과 상호작용하여 반응 성이 매우 강한 수산화 라디칼을 발생시키는 과정에서 다른 항산화 효소와 함께 작용하여 수산화 라디칼 증가를 억제시키는데 이 과정에서 SOD 농 도가 증가 될 수 있다(Winston and Di Guilio, 1991; Parihar et al., 1997). CAT는 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 H<sub>2</sub>O과 O<sub>2</sub>로 분해하는 효소로써(Kim and Kang 2015) 화 학적으로 스트레스를 받게 되면 체내 CAT활성은 증가 또는 감소가 나타 나며 이것은 화학물질의 종류, 노출시간, 노출 양에 따라 다르게 나타난다 (Jemec A at al., 2008). GST는 Phase II 대사 효소계로써 endogenous compounds, xenobiotics 및 phase I 대사 효소에 의해 생성된 1차 대사물 질의 무독화와 배설에 중요한 역할을 담당한다(Clark, 1989). 또한 세포 시 스템에서 방어기전으로 전자 친화성 물질과 GSH와의 결합을 촉매시키는 기능을 통해 항산화 효소로 작용한다(Atli, G., & Canli, M, 2010). GSH는 쉽게 산화되지만 산화 스트레스를 유발하는 금속과 결합할 수 있는 중요한 항산화제로써(Hansen BH at al., 2007) 산화된 GSH는 GR에 의해 다시 환 원형 GSH로 되면서 항산화제로써의 역할을 수행한다. 세포 내 GSH의 항 산화 작용은 농도, 산화·환원에 따른 회전율 그리고 합성 속도에 따라 그 영향이 달라질 수 있다(Potter DW at al., 1993). 여러 어종에 있어서 중금 속 노출에 따른 반응은 노출시간, 양에 따라 GSH의 증가 또는 감소가 보 고된 바 있다(Sayeed, I at al., 2003; Atli, G at al., 2008).

비타민C(ascorbic acid, AsA)는 대부분의 수생 동물의 정상적인 성장과 생리 기능에 필수적인 미량 영양소이다(Ren et al., 2007). 하지만 어류는 AsA합성에 관여하는 L-gulonolactone oxidase가 없기 때문에 자체적으로 AsA를 합성 할 수 없고 따라서 외인성 경로에 의존한다(Di Giulio and Meyer 2008). AsA는 ROS를 제거 할 수 있는 강력한 항산화제로써(Bae et al., 2012) 조직에 대한 산화적 손상을 감소시키며(Dabrowski, 2001; Khassaf et al., 2003) 성장, 생존율, 골격기형율 감소(Dabrowski, 1992)에 도움을 주고 스테로이드성 호르몬, 콜라겐 합성(Cavalli et al., 2003; Hunter et al., 1979; Lightner et al., 1979) 그리고 환경성 스트레스 요인에 대한 내성(Agrawal et al., 1978; Ishibashi et al., 1992; Merchie et al., 1995), 면역반응(Lin and Shiau, 2005)등 많은 기전에 관여한다. 또한 비타 민E의 재생과 같은 다른 주요 항산화제의 redox recycling에도 중요한 역 할을 한다(Bruno et al., 2006). 하지만 일반적인 L-Ascorbic acid의 형태는 불안정하며 사실상 사료의 가공·저장 과정에서 열, 빛에 노출되기 때문에 대부분의 활성이 손실될 수 있다(Hilton et al., 1977; Lovell and Lim, 1978; Soliman et al., 1987). Shiau and Hsu(1993)의 연구 결과에서는 Penaeus monodon 사료에 첨가된 L-ascorbic acid 활성의 75%가 제조 과 정에서 손실되었다고 보고되었다. 물론 지질, 에틸셀룰로오스 등 다른 물질 에 의한 코팅 또는 캡슐화를 통해 활성의 손실을 줄일 수는 있지만 이것은 한계가 있다. 따라서 수중 사료에 있어서 보다 더 안정적인 형태의 AsA공 급이 필요하며, 안정된 형태로의 AsA 이용은 어류의 AsA요구량을 보다 정확하게 평가 할 수 있다(Henrique et al., 1998). AsA 유도체 중 L-Ascorbyl-2-monophospate(AMP)는 급이식 AsA사료의 물질로써 효과 적으로 간주된다(X Wang at al., 2003). L-ascorbic acid의 형태는 수중에 서 불안정하지만 락톤고리의 C-2 position에 황산염과 인산염을 가진 AsA

유도체는 산화 저항성이 높다고 알려져 있다(Tolbert et al., 1975). AsA 유도체 효능에 대한 연구결과에서는 *Penaeus monodon*의 AsA 요구량을 충족시키는 AMP의 효능이 L-ascorbyl-2-sulfate의 4배로 보고되었으며 (Shiau, S. Y., &Hsu, T. S., 1995) 다른 연구결과로 AsA 요구량이 L-ascorbic acid는 2000mg/kg(Shiau and Jan, 1992)이었던 반면 인산염 유 도체인 L-ascorbyl-2-polyphosphate(APP)는 210mg/kg, AMP는 40mg/kg 까지 감소했다(Shiau and Hsu, 1994). Matusiewicz & Dabrowski(1995)의 연구결과에 의하면 어류 중 *Oncorhynchus mykiss*는 장에 풍부하게 존재 하는 alkaline phosphatase가 ascorbate phosphate hydrolase로 작용하여 활성화된 AsA를 체내에 순환 시킨다고 보고한 바 있다. 이러한 연구결과 를 바탕으로 본 연구에서는 카드뮴 독성에 대한 해독물질로써 AsA의 인 산염 유도체인 L-Ascorbyl-2-monophospate (AMP)를 사용하였다.

한국에서 강도다리는 공식이 없고 저수온(10°C)에서 성장이 가능하며 급 격한 환경변화에도 성장이 가능하다는 이점으로 인해 가장 양식이 많이 되 고 있는 넙치를 대체할 수 있는 어종 중 하나이다(Kim et al., 2009). 해양 생물에 있어서 AsA의 인산염 유도체에 따른 생체 내 활성은 channel catfish(El Naggar and Lovell, 1991a,b), tilapia(Soliman et al., 1986; Shiau and Hsu, 1995), rainbow trout(Miyasaki et al., 1992; Cho and Cowey, 1993; Dabrowski et al., 1996), yellowtail (Kanazawa at al., 1992), parrot fish(Wang, X., 2003) 등의 어류에서 연구된 바가 있지만 강도다리에 있어 서의 연구는 부족한 실정이다. AsA의 요구량은 어종, 개체크기, 사료 배합, 사육조건 등에 따라 달라지며(Ai et al., 2006) AsA 유도체는 일반적으로 생물마다 그 이용성이 다르다(Wang, X at al, 2003). 따라서 본 연구에서 는 강도다리의 카드륨 독성에 따른 L-ascorby1-2-polyphosphate (AMP)의 해독효과를 평가하기 위해 Bioaccumulation, Growth performance, 혈액학 적 분석, 항산화효소 분석을 하였다.



### Ⅱ. 재료 및 방법

#### 1. 실험어 및 실험환경

실험어 강도다리, *Platichthys stellatus*(체중 139.47±1.41g, 전장 19.87±0.21cm)는 기장에서 분양받았으며, 15마리씩 12구간의 150L의 중앙 유수식 원통 수조로 옮겨, 1주일 간 순치하였으며 순치기간 동안 수온은 사육 적정수온인 12.0±1.0°C, 광주기 12h light : 12h dark로 일정한 상태를 유지했으며 카드뮴이 포함되지 않은 사료를 공급하였다. 실험에 사용된 수 질성분은 Table. 1과 같다.

실험에 사용한 혼합사료의 농도는 카드뮴 0, 40, 80 mg/kg, L-ascorbyl-2-monophosphate(AMP) 0, 200, 400, 800 mg/kg 으로 총 12종 류의 혼합사료를 제작하였고 각 구간의 실험어는 농도 별 사료를 하루에 체중의 2%씩(하루 2회, 1%씩) 공급했다. 실험 기간은 총 4주로 실험어는 혼합사료 공급 후 각각 2, 4주후 샘플링하였다.

Table. 1. The chemical components of seawater and experimental condition used in the experiments.

Item	Value					
Temperature (°C)	12.0±1.0					
pH	8.1±0.5					
Salinity (‰)	33.5±0.6					
Dissolved Oxygen (mg/L)	7.2±0.3					
Chemical Oxygen Demand ( $\mu$ g/L)	1.17±0.1					
Ammonia (mg/L)	11.5±0.7					
Nitrite (mg/L)	1.3±0.3					
Nitrate (mg/L)	11.43±1.0					
OXYNA AT	H OL III					

#### 2. 사료성분 및 배합

사료성분 및 배합은 Table. 2에 나타내었다. 사료는 국립수산과학원 동해 수산연구소 소속, 동해특성화 연구센터에서 발간한 강도다리 양식 기술서 를 바탕으로 강도다리의 영양요구에 맞춰 제작하였다. 기본구성 성분 white fish meal 62%, casein 10 %, dextrin 19.42 %, fish oil 2 %, squid fish oil 2 %, carboxymethylcellulose 1 %, vitamin Premix (AsA-free) 1 %, mineral Premix 1 %, coline salt 0.5 %에 카드뮴 프리믹 스와 AMP 프리믹스를 각 구간의 설정 농도에 맞춰 첨가하였다. 카드뮴 프리믹스는 카드뮴 10g과 셀롤로오스 340g을 혼합하여 3일간 벌크 작업을 통해 제작하였으며 카드뮴 농도에 따른 3종류의 사료에 포함된 실제 카드 농도는 각각 0, 40, 80 mg/kg 이었다. AMP 뮦 프리믹스는 L-ascorbyl-2-monophosphate 50g과 셀롤로오스 450g을 혼합하여 3일간 벌크 작업을 통해 제작하였으며 AMP 농도에 따른 4종류의 사료에 포함된 실제 AMP 농도는 각각 0, 200, 400, 800 mg/kg 이었다. 사료 제작 순서로 는 먼저 분말형태의 성분을 정해진 비율로 잘 섞은 후, oil과 물을 넣어서 반죽형태로 만들었다. 만들어진 반죽을 분쇄기로 뽑은 다음 펠릿화 한 후 실온에서 48시간 건조시켰다. 완성된 사료는 실험 전까지 -20℃에서 보관 했다. 사료 내 카드뮴 농도는 ELAN 6600DRC ICP-MS 기기를 사용해 측 정하였고 standard curve로 ICP multi-element standard solution VI (Merck)를 이용하였다.

	Concentration (mg/kg)											
Ingredient (%)	M0	M0	M0	M0	M4	M4	M4	M4	M8	M8	M8	M8
	V0	V2	V4	V8	V0	V2	V4	V8	V0	V2	V4	V8
White fish meal <sup>1</sup>	62	62	62	62	62	62	62	62	62	62	62	62
Casein <sup>2</sup>	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
Dextrin <sup>3</sup>	19.42	19.42	19.42	19.42	19.42	19.42	19.42	19.42	19.42	19.42	19.42	19.42
Fish oil <sup>4</sup>	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Squid liver oil <sup>5</sup>	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Carboxymethylcellulose <sup>6</sup>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
a-Cellulose <sup>7</sup>	1.08	0.88	0.68	0.28	0.94	0.74	0.54	0.14	0.8	0.6	0.4	0
Vitamin Premix	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
(AsA-free) <sup>8</sup>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Mineral Premix9	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Coline salt <sup>10</sup>	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Cadmium premix <sup>11</sup>	0	0	0	0	0.14	0.14	0.14	0.14	0.28	0.28	0.28	0.28
AMP premix <sup>12</sup>	0	0.2	0.4	0.8	0	0.2	0.4	0.8	0	0.2	0.4	0.8
Total	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100

Table. 2. Formulation of the experimental diet (% dry matter)

1. White fish meal, Dajeon Co., Ltd., Pusan, Korea

2. Casein, The Feed Co., Ltd., Pusan, Korea

3. Dextrin, TS Co., Ltd., Incheon, Korea

4. Fish oil, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO

5. Squid liver oil, Sigma, USA

6. Carboxymethylcellulose, Sigma, USA

7. α-Cellulose, Sigma, USA

8. Vitamin Premix (AsA-free) (mg/kg diet): dl-calcium pantothenate, 368; Choline chloride, 10; Inositol, 400; Menadione, 1800; Nicotinamide, 1030; Pyridoxine·HCl, 88; Riboflavin, 380; Thiamine mononitrate, 115; dl-a-tocopherol acetate, 210; Retinyl acetate, 38; Biotin, 10; Folic acid, 20; Cyanocobalamin, 1.3; Cholecalcifero, 13.2

9. Mineral Premix (g/kg): Ferrous Fumarate, 12.5: Dried Ferrous sulfate, 20: Manganese Sulfate, 11.25: Dried Cupric Sulfate. 1.25: Cobaltous sulfate, 0.75, Zinc sulfate, 13.75: Calcium iodate, 0.75, Magnesium Sulfate, 80.2: Aluminum Hydroxide, 0.75

10. Coline salt, Kofavet Co., Ltd., Ulsan, Korea

11. Cadmium premix (mg/kg diet): 28,000 mg Cd/ kg diet

12. L-ascorbyl-2-monophosphate premix (mg/kg) : 100,000 mg AMP /kg diet (M0: Cd 0 mg/kg, M4: Cd 40 mg/kg, M8: Cd 80 mg/kg, V0: AMP 0 mg/kg, V2: AMP 200 mg/kg, V4: AMP 400 mg/kg, V8: AMP 800 mg/kg)



#### 3. Bioaccumulation

실험어 강도다리의 간, 아가미, 신장, 비장, 장, 근육의 조직 샘플을 동결 건조한 후, 건조중량을 측정하였다. 시료를 분해시키기 위해 wet digestion method를 이용해 65% NHO<sub>3</sub>(Merk, 65% ulta pure)로 용해시킨 후 hot plate에서 120℃로 재건조 시켰다. 이 과정은 유기물이 완전 분해 될 때까 지 반복되었다. 유기물이 완전 분해된 시료는 2% NHO<sub>3</sub>으로 용해시켜 압 력 하에 0.2 µm membrane filter(Advantec mfs, Ins.)로 필터링 후 분석에 사용하였다. ELAN 6600DRC ICP-MS(Perkin-Elmer) 기기를 이용해 카드 뮴의 함유량을 분석하였고 standard curve로 ICP multi-element standard solution VI (Merck)를 이용하였다. 조직샘플 내 카드뮴 양은 mg/kg dry wt으로 나타내었다.

#### 4. Growth performance

실험 전 강도다리의 전장과 체중을 전수 측정하였고, 혼합사료 급이 2, 4 주차에 전장, 체중, 간중량을 재측정하였다. 분석요소로 일일전장성장량 (Daily growth gain), 일일체중성장량(Daily weight gain), 비만도 지수 (Condition factor), 간중량 지수(hepatosomatic index, HIS)를 다음과 같이 측정 하였다.

IT II

- Daily growth gain = Final length-initial length/day
- Daily weight gain = Final weight-initial weight/day
- Condition factor (%) = (W/L3)x100
  - (W = weight (g), L = length (cm))
- HIS = (liver weight/ total fish weight) x 100

#### 5. 혈액학적 분석

혈액 샘플의 응고를 방지하기 위해 heparin-Na(5000 I.U., 중외제약)가 처 리된 1회용 주사기를 사용하여 미부정맥(caudal vein)으로부터 채취하였다. 채취된 혈액에서 total red blood cell (RBC) count, hemoglobin (Hb), 그리 고 hematocrit (Ht) 값은 혈액 수집 후 즉시 분석하였다.

total red blood cell (RBC)은 Hendrick's solution으로 400배 희석시킨 후 hemocytometer(Improved Neubauer, Germany)를 이용하여 광학현미경으 로 계수하여 다시 계산하였다. Hb 농도는 Cyan-methemoglobin technique 를 이용한 임상용 kit (Asan Pharm. Co., Ltd.)를 사용해 분석하였다. Ht는 microhematocrit centrifugation technique을 이용하였고 microhematocrit capillary tube 내로 혈액을 모아서 microhematocrit centrifugation(Model; 01501, HAWKSLEY AND SONS Ltd., England)로 4°C에서 5분간 12000rpm으로 원심분리 후 판독판(Micro-Haematocrit reader, HAWKSLEY AND SONS Ltd., England)을 통해 측정하였다.

채취한 혈액은 무기성분, 유기성분, 효소활성을 측정하기 위해 4℃, 3000g 에서 5분간 원심분리시켜 혈청으로 분리 후 분석전까지 -75℃에 보관하였 다. 무기성분인 칼슘(Calcium), 마그네슘(Magnesium) 중 칼슘은 o-cresolphthalein-complexon technique, 마그네슘은 xvlidvl blue technique을 이용한 임상용 kit (Asan Pharm. Co., Ltd.)를 사용하여 분석 하였다. 유기성분인 혈당(Glucose), 총단백질(Total protein), 총콜레스테롤 (Total cholesterol)중 혈당은 GOD/POD technique, 총단백질은 biuret technique, 총콜레스테롤은 Enzyme technique을 이용한 임상용 kit (Asan Pharm. Co., Ltd.)를 사용하여 분석하였다. 혈청 내 효소활성으로는 glutamic oxalate transaminase (GOT), glutamic pyruvate transaminase (GPT)를 Reitman-Frankel technique을 이용한 임상용 kit (Asan Pharm. Co., Ltd.)를 사용하여 분석하였다.



#### 6. 항산화효소 분석

항산화 효소의 활성을 분석하기 위해 실험어 강도다리의 간, 아가미 조직 을 절제하였다. 절제한 조직은 washing buffer(0.1M KCl, pH 7.4)로 세척 후 간, 아가미의 10배에 해당하는 homogenizing buffer(0.1M PBS, pH 7.4) 로 Teflon-glass homogenizer (099CK4424, Glass-Col, Germany)를 이용해 균질화하였다. 균질액은 4℃, 10000g에서 30분간 원심분리 후 상층액을 분 리하여 분석에 사용하였다.

#### 6-1. Superoxide dismutase (SOD)

SOD 활성은 WST-1의 환원 반응에 대한 50 % inhibitor rate로 측정하 는 SOD Assay kit(Dojindo Molecular Technologies, Inc.)를 사용하여 분 석하였다. 1 unit은 WST-1과 superoxide 음이온의 환원 반응을 50 % 억 제하는 시료 용액 20 µl 중의 효소의 양으로 나타내었으며 SOD activity는 unit/mg protein으로 나타내었다.

 $*WST - 1 = 2 - (4 - 1 \circ d \circ p h e n y 1) - 3 - (4 - n i t r \circ p h e n y 1) - 5 - (2,4-disulfophenyl) - 2H - tetrazolium, monosodium salt$ 

#### 6-2. Catalase (CAT)

CAT 활성은 OxiSelect<sup>™</sup> Catalase Assay Kit (Cell Biolabs, Inc.)를 사용 하여 분석하였다. 반응 혼합물에 남아있는 과산화수소의 양과 연관된 quinonimine dye coupling 생성물을 520 nm에서 흡광도를 측정하였다. CAT의 1 unit은 25℃에서 1분당 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1µM을 분해하는 효소의 양으로 나 타내었으며, CAT activity는 unit/mg protein로 나타내었다.

#### 6-3. Glutathione s-transferase (GST)

Glutathione-S-transferase(GST)는 Habic (1974)의 방법을 변형하여 측정 하였다. 일정량의 시료에 0.2 M phosphate buffer (pH 6.5), 10 mM GSH(Sigma), 10 mM 1-chloro-2,-dinitrobenzene, CDNB (Sigma)을 순차 적으로 혼합시켰다. 혼합물을 흡광도 340nm에서 30초 간격으로 5분동안 측정하였다. GST activity는 흡광도의 변화가 가장 큰 간격을 사용하여 측 정하였고 nmol/min/mg protein로 나타내었다.

#### 6-4. Glutathione (GSH)

Reduced glutathione은 Beutler et al. (1963)의 방법에 의해 측적되었다. 샘플 20네을 증류수 180네에 첨가 후 300네의 precipitating solution을(0.167 g metaphosphoric acid, 0.02 g EDTA and 3 g NaCl in 10ml distilled water)를 희석된 상청액 샘플에 혼합하였다. 이 혼합물의 40네에 NaHPO4 solution과 0.5mL DTNB (5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoic acid)를 순차적으로 첨가 후 흡광도 412nm에서 측정하였으며 검량선으로 L-glutathione reduced, minimum 98% (sigma aldrich Co., Korea)을 사용하였다. GSH

### 7. 유의성 검정

실험 분석 결과에 대한 통계학적 유의성은 SPSS 통계 프로그램 (SPSS Inc.)을 이용하였고, ANOVA test를 실시하여 Duncan's multiple range test를 통해 P <0.05 일 때 유의성이 있는 것으로 간주하였다.



## Ⅲ. 결 과

#### 1. Bioaccumulation

Cd-AMP 혼합사료 급이에 따른 강도다리의 간, 아가미, 신장, 비장, 장, 근육의 Cd 축적은 Fig. 1-3에 나타내었다. 조직별 축적량은 장〉간〉신 장〉비장〉아가미〉근육 순이었으며 2, 4주차 Cd 40 mg/kg 이상에서 유의 한 증가가 나타났다. 간에서는 2주차 Cd 80 mg/kg 의 AMP 800mg/kg 과 4주차 Cd 40, 80 mg/kg 의 AMP 800 mg/kg에서 AMP 0, 200, 400 mg/kg 에 비해 유의한 감소를 나타냈다. 아가미에서는 2주차 Cd 40, 80 mg/kg에서 AMP 농도에 따른 큰 변화는 나타내지 않았지만, 4주차 Cd 40, 80 mg/kg의 AMP 800mg/kg에서 0, 200, 400 mg/kg 에 비해 유의한 감소를 나타냈다. 신장에서는 4주차 Cd 40 mg/kg 의 AMP 400, 800 mg/kg에서 0, 200 mg/kg 에 비해 유의한 감소를 나타냈다. 비장에서는 2 주차 Cd 80 mg/kg 의 AMP 400, 800 mg/kg에서 0, 200mg/kg 에 비해 유 의한 감소를 나타냈으며, 4주차 Cd 40, 80 mg/kg의 AMP 800mg/kg에서 0, 200, 400 mg/kg 에 비해 유의한 감소를 나타냈다. 장은 축적량이 가장 높은 조직이었으며 2주차 Cd 40, 80 mg/kg 의 AMP 800 mg/kg 과 4주차 Cd 40 mg/kg 의 AMP 800 mg/kg에서 0, 200, 400 mg/kg 에 비해 유의한 감소를 나타냈다. 근육은 2, 4주차 Cd 80 mg/kg 의 AMP 0 mg/kg 구간 을 제외한 다른 구간에서는 유의한 변화가 관찰되지 않았다.



Fig. 1. Cd accumulation in liver and gill of starry flounder, *Platichthys stellatus* combinedly exposed to the different concentration of dietary cadmium and L-Ascorbyl-2-monophospate for 4 weeks. Values with different superscript are significantly different in 2 and 4 weeks (P < 0.05) as determined by Duncan's multiple range test.



Fig. 2. Cd accumulation in kidney and spleen of starry flounder, *Platichthys stellatus* combinedly exposed to the different concentration of dietary cadmium and L-Ascorbyl-2-monophospate for 4 weeks. Values with different superscript are significantly different in 2 and 4 weeks (P < 0.05) as determined by Duncan's multiple range test.



Fig. 3. Cd accumulation in intestine and muscle of starry flounder, *Platichthys stellatus* combinedly exposed to the different concentration of dietary cadmium and L-Ascorbyl-2-monophospate for 4 weeks. Values with different superscript are significantly different in 2 and 4 weeks (P < 0.05) as determined by Duncan's multiple range test.

#### 2. Growth performance

Cd-AMP 혼합사료 급이에 따른 강도다리의 일일전장성장량(Daily growth gain), 일일체중성장량(Daily weight gain), 비만도 지수(Condition factor), 간중량 지수(hepatosomatic index, HIS)는 Fig.4-5에 나타내었다. 일일전장성장량의 경우 2주차 Cd 80 mg/kg 의 AMP 0, 200 mg/kg 에서 유의한 감소를 나타냈지만 다른 구간에서는 변화를 나타내지 않았다. 4주 차에서는 Cd 40 mg/kg 의 AMP 0, 200, 400 mg/kg 에서 유의한 감소를 나타냈지만 AMP 800 mg/kg 에서는 변화를 나타내지 않았고 Cd 80 mg/kg 의 모든 AMP 농도 구간에서 유의한 감소를 나타내었다. 일일체중 성장량의 경우 2주차 Cd 80 mg/kg 의 AMP 0, 200, 400 mg/kg 에서는 유의한 감소를 나타냈지만 다른 구간에서는 변화를 나타내지 않았다. 4주 차에서는 Cd 40 mg/kg 의 AMP 0 mg/kg에서 유의한 감소를 나타내었고 Cd 80 mg/kg 의 모든 AMP 농도 구간에서 유의한 감소를 나타내었다. 비 만도 지수의 경우 2주차 Cd 80 mg/kg 의 AMP 0, 200, 400 mg/kg 에서 는 유의한 감소를 나타냈지만 다른 구간에서는 유의한 변화를 나타내지 않 았다. 4주차에서는 Cd 40 mg/kg 의 AMP 0, 200, 400 mg/kg 에서는 유의 한 감소를 나타냈지만 AMP 800 mg/kg 에서는 유의한 변화를 나타내지 않았고 Cd 80 mg/kg 의 모든 AMP 농도 구간에서 유의한 감소를 나타냈 다. 간중량 지수의 경우 2, 4주차 Cd 40 mg/kg 의 AMP 800mg/kg을 제 외한 모든 Cd 40 mg/kg 이상에서 유의한 감소를 나타내었다.



Fig. 4. Daily length and daily weight gain of starry flounder, Platichthys stellatus combinedly exposed to the different concentration of dietary cadmium and L-Ascorbyl-2-monophospate for 4 weeks. Values with different superscript are significantly different in 2 and 4 weeks (P < 0.05) as determined by Duncan's multiple range test.



Fig. 5. Condition factor and hepatosomatic index of starry flounder, Platichthys stellatus combinedly exposed to the different concentration of dietary cadmium and L-Ascorbyl-2-monophospate for 4 weeks. Values with different superscript are significantly different in 2 and 4 weeks (P < 0.05) as determined by Duncan's multiple range test.

#### 3. 혈액학적 분석

Cd-AMP 혼합사료 급이에 따른 강도다리의 RBC count, hematocrit value, hemoglobin concentration 은 Table. 3에 나타내었다. RBC count는 2, 4주차 Cd 40 mg/kg 이상에서 유의한 감소를 나타내었고 Cd 40, 80 mg/kg에서 AMP 농도에 따른 변화는 나타나지 않았다. hematocrit value 는 2주차 Cd 40 mg/kg 의 AMP 0, 200, 400 mg/kg 에서는 유의한 감소 를 나타냈지만 AMP 800 mg/kg 에서는 유의한 변화가 나타나지 않았고 Cd 80 mg/kg 의 모든 AMP 농도 구간에서 유의한 감소를 나타내었고 Cd 40, 80 mg/kg에서 AMP 농도에 따른 변화는 나타나지 않았다. hemoglobin concentration은 2주차 Cd 40 mg/kg 이상에서 유의한 감소를 나타냈고 Cd 40, 80 mg/kg에서 AMP 농도에 따른 변화는 나타나지 않았다. 4주차에서 는 Cd 40 mg/kg 의 AMP 0, 200, 400 mg/kg 에서 유의한 감소를 나타냈고 Cd 40, 80 mg/kg에서 AMP 농도에 따른 변화는 나타나지 않았다. 4주차에서 는 Cd 40 mg/kg 에서 변화는 나타나지 않았고 Cd 80 mg/kg 의 모 든 AMP 농도 구간에서 유의한 감소를 나타냈다.

Cd-AMP 혼합사료 급이에 따른 강도다리의 혈청 내 성분변화는 Table. 4-6에 나타내었다. 무기성분으로는 칼슘과 마그네슘을 분석하였다. 무기성 분 중 칼슘은 2, 4주차 Cd 40, 80 mg/kg의 AMP 0, 200 mg/kg에서 유의 한 감소를 나타냈지만 AMP 400, 800 mg/kg에서는 유의한 변화를 나타내 지 않았다. 마그네슘은 2, 4주차 Cd 80 mg/kg의 AMP 0, 200, 400 mg/kg 에서 유의한 감소를 나타냈지만 AMP 800 mg/kg에서는 유의한 변화를 나 타내지 않았다. 유기성분으로 혈당, 총단백질, 총콜레스테롤을 분석하였다. 유기성분 중 혈당은 2, 4주차 Cd 40 mg/kg 이상에서 유의한 증가를 나타 내었고 AMP 농도에 따른 변화는 나타나지 않았다. 총단백질은 모든 구간

에서 유의한 변화를 나타내지 않았고, 총 콜레스테롤은 2주차 Cd 80 mg/kg에서 유의한 증가를 나타내었다. 4주차에서는 Cd 40 mg/kg 의 AMP 0, 200 mg/kg에서 유의한 증가를 나타내었지만 AMP 400, 800 mg/kg에서는 유의한 변화를 나타내지 않았고 Cd 80 mg/kg에서 유의한 증가를 나타내었다. 효소활성으로 GOT, GPT를 분석하였다. 효소성분 중 GOT는 2, 4주차 Cd 40 mg/kg 의 AMP 0, 200 mg/kg에서 유의한 증가를 나타내었지만 AMP 400, 800 mg/kg에서는 유의한 변화를 나타내지 않았 고 Cd 80 mg/kg의 모든 AMP 농도 구간에서 유의한 증가를 나타냈다. GPT 2, 4주차 Cd 40 mg/kg 의 AMP 0, 200, 400 mg/kg에서 유의한 증가 를 나타냈었지만 800 mg/kg에서는 유의한 변화를 나타내지 않았고 Cd 80 mg/kg의 모든 AMP % 200, 400 mg/kg에서 유의한 증가 를 나타냈었지만 800 mg/kg에서는 유의한 변화를 나타내지 않았고 Cd 80 mg/kg의 모든 AMP % 주가를 나타내지 않았고 Cd 80 mg/kg의 모든 AMP % 주가를 나타내지 않았고 Cd 80 mg/kg의 모든 AMP % 주가를 나타내지 않았고 Cd 80 mg/kg의 모든 AMP % 주가를 나타내지 않았고 Cd 80 mg/kg의 모든 AMP % 주가를 나타내지 않았고 Cd 80 mg/kg의 모든 AMP % 주가를 나타내지 않았고 Cd 80 mg/kg의 모든 AMP % 유의한 증가를 나타내지 않았고 Cd 80 mg/kg의 모든 AMP % 주가를 나타내지 않았고 Cd 80 mg/kg의 모든 AMP % 주가를 나타내지 않았고 Cd 80 mg/kg의 모든 AMP % 주가를 나타내지 않았고 Cd 80 mg/kg의 모든 AMP % 주가를 나타내지 않았고 Cd 80 mg/kg의 모든 AMP % 유의한 증가를 나타내지 않았고 Cd 80 mg/kg의 모든 AMP % 주가를 나타내지 않았고 Cd 80 mg/kg의 모든 AMP % 주가를 나타내지 않았고 % %



Para meters	Period (weeks)	cadmium. L-ascorbyl-2-monophosphate concentration (mg/kg)											
		C0V0	C0V2	C0V4	C0V8	C4V0	C4V2	C4V4	C4V8	C8V0	C8V2	C8V4	C8V8
RBC	0	246.14±	249.16	252.36	275.43	231.12	234.67	239.57	236.16	195.13	191.67	217.86	220.14
count (X10 <sup>4</sup> mm <sup>3</sup> )	L	$20.82^{ab}$	$\pm 22.95^{\text{ab}}$	$\pm 22.25^{\text{ab}}$	$\pm 16.26^{a}$	$\pm 16.40^{b}$	±18.00 <sup>b</sup>	±18.84 <sup>b</sup>	$\pm 18.48^{b}$	$\pm 16.50^{\circ}$	$\pm 16.50^{\circ}$	$\pm 16.22^{\rm bc}$	$\pm 16.93^{\rm bc}$
	4	254.43	250.57	271.26	274.14	216.32	218.43	237.14	232.33	190.33	192.57	194.21	196.05
		$\pm 19.61^{\text{ab}}$	$\pm 22.34^{ab}$	$\pm 16.34^{a}$	$\pm 21.95^{a}$	$\pm 16.22^{\rm bc}$	$\pm 16.00^{\mathrm{bc}}$	±18.21 <sup>b</sup>	±19.05 <sup>b</sup>	$\pm 16.65^{\circ}$	$\pm 16.60^{\circ}$	±17.27°	±16.88°
Hemato crit - (%)	2	24.92	25.25	25.64	27.73	23.41	23.57	24.10	24.61	19.75	20.13	22.33	22.80
		$\pm 1.57^{ab}$	$\pm 1.35^{ab}$	$\pm 2.24^{ab}$	$\pm 1.62^{a}$	$\pm 2.40^{b}$	±1.23 <sup>b</sup>	$\pm 1.48^{\rm b}$	$\pm 1.78^{\text{ab}}$	±2.25°	±1.23°	$\pm 1.33^{\rm bc}$	$\pm 1.55^{\rm bc}$
	4	24.59	24.21	25.01	27.25	22.70	23.33	23.72	24.04	20.43	20.13	21.79	22.39
		$\pm 1.48^{\text{ab}}$	$\pm 1.35^{ab}$	$\pm 2.40^{ab}$	±2.25ª	$\pm 1.55^{\rm bc}$	$\pm 1.33^{\rm bc}$	±1.23 <sup>b</sup>	±1.94 <sup>b</sup>	±1.62°	$\pm 1.23^{\circ}$	$\pm 1.88^{\rm bc}$	$\pm 1.57^{\rm bc}$
Hemo globin - (g/dL)	2	6.02	6.04	6.13	6.62	5.77	5.91	5.93	5.96	5.26	5.45	5.68	5.50
		$\pm 0.34^{\text{ab}}$	$\pm 0.39^{ab}$	$\pm 0.28^{ab}$	$\pm 0.31^{a}$	$\pm 0.28^{\rm bc}$	$\pm 0.42^{\rm bc}$	$\pm 0.27^{b}$	±0.35 <sup>b</sup>	±0.43°	±0.33 <sup>bc</sup>	$\pm 0.36^{\rm bc}$	$\pm 0.38^{\rm bc}$
	1	6.07	6.24	6.31	6.68	5.78	5.97	5.98	6.01	5.26	5.63	5.65	5.66
	4	$\pm 0.31^{ab}$	$\pm 0.46^{ab}$	$\pm 0.38^{ab}$	$\pm 0.35^{a}$	$\pm 0.32^{\rm bc}$	$\pm 0.35^{b}$	$\pm 0.42^{b}$	$\pm 0.37^{ab}$	$\pm 0.32^{\circ}$	$\pm 0.35^{\rm bc}$	$\pm 0.44^{\rm bc}$	$\pm 0.33^{\rm bc}$

Table. 3. Change of RBC count, Hematocrit, Hemoglobin and HSI in starry flounder, *Platichthys stellatus* combinedly exposed to different concentration of dietary cadmium and L-ascorbyl-2-monophosphate 4 weeks

Values are mean±S.D. Values with a different letter are significantly different from others at 2 weeks and at 4 weeks (P<0.05) as determined by Duncan's multiple range test.
Para meters	Period (weeks)	cadmium, L-ascorbyl-2-monophosphate concentration (mg/kg)											
		C0V0	C0V2	C0V4	C0V8	C4V0	C4V2	C4V4	C4V8	C8V0	C8V2	C8V4	C8V8
Calcium (mg/dL)	2	8.35	8.44	8.49	8.53	6.86	7.04	7.72	8.21	6.55	6.78	7.35	7.51
		$\pm 0.54^{a}$	$\pm 0.72^{a}$	±0.73ª	$\pm 0.57^{a}$	$\pm 0.51^{b}$	±0.53 <sup>b</sup>	$\pm 0.73^{ab}$	±0.55ª	$\pm 0.52^{b}$	$\pm 0.53^{b}$	$\pm 0.67^{ab}$	$\pm 0.70^{\text{ab}}$
	4	7.67	8.25	8.38	8.43	6.77	6.85	7.42	8.13	6.65	6.71	7.31	7.37
		$\pm 0.66^{ab}$	$\pm 0.62^{a}$	$\pm 0.61^{a}$	$\pm 0.56^{a}$	$\pm 0.59^{b}$	$\pm 0.58^{\rm b}$	$\pm 0.54^{ab}$	±0.54ª	$\pm 0.54^{\rm b}$	$\pm 0.53^{b}$	$\pm 0.66^{ab}$	$\pm 0.55^{ab}$
	2	4.15	4.23	4.17	4.26	3.97	4.06	4.09	4.11	3.48	3.41	3.55	3.80
Magne sium (mg/dL)		$\pm 0.22^{a}$	$\pm 0.23^{a}$	±0.25ª	±0.26 <sup>a</sup>	±0.23ª	±0.23ª	$\pm 0.23^{a}$	±0.23 <sup>a</sup>	±0.25 <sup>b</sup>	$\pm 0.24^{b}$	$\pm 0.25^{\rm b}$	$\pm 0.23^{ab}$
	4	4.01	4.08	4.05	4.13	3.70	3.83	3.94	3.89	3.35	3.31	3.25	3.66
		$\pm 0.25^{a}$	$\pm 0.23^{a}$	$\pm 0.24^{a}$	±0.23 <sup>a</sup>	$\pm 0.26^{ab}$	$\pm 0.23^{a}$	±0.23ª	±0.23ª	±0.26 <sup>b</sup>	$\pm 0.24^{b}$	$\pm 0.24^{\rm b}$	$\pm 0.26^{ab}$

Table. 4. Change of Calcium, Magnesium in starry flounder, *Platichthys stellatus* combinedly exposed to different concentration of dietary cadmium and L-ascorbyl-2-monophosphate 4 weeks

Values are mean±S.D. Values with a different letter are significantly different from others at 2 weeks and at 4 weeks (P<0.05) as determined by Duncan's multiple range test.

Para meters	Period (weeks)	cadmium, L-ascorbyl-2-monophosphate concentration (mg/kg)												
		C0V0	C0V2	C0V4	C0V8	C4V0	C4V2	C4V4	C4V8	C8V0	C8V2	C8V4	C8V8	
Glucose (mg/dL)	2	87.06	85.13	85.95	84.26	96.82	97.61	95.71	94.68	104.24	103.35	99.47	98.52	
		$\pm 4.90^{a}$	$\pm 4.18^{a}$	$\pm 4.39^{a}$	$\pm 4.10^{a}$	$\pm 4.78^{bc}$	$\pm 4.93^{\rm bc}$	$\pm 4.68^{\rm bc}$	±4.36 <sup>b</sup>	$\pm 4.30^{\circ}$	$\pm 4.54^{\circ}$	$\pm 4.31^{\rm bc}$	$\pm 4.06^{\text{bc}}$	
	4	87.27	86.21	85.42	84.71	98.43	96.34	97.15	95.49	104.39	103.85	103.58	99.52	
		$\pm 4.31^{a}$	$\pm 4.59^{a}$	$\pm 4.12^{a}$	$\pm 4.75^{a}$	±4.37 <sup>bc</sup>	$\pm 4.07^{\rm bc}$	$\pm 4.35^{\rm bc}$	$\pm 4.07^{\rm b}$	±4.28°	$\pm 4.10^{\circ}$	$\pm 4.01^{\circ}$	$\pm 4.16^{\rm bc}$	
	2	3.01	3.03	3.08	2.98	3.21	3.10	3.13	3.17	3.38	3.35	3.31	3.27	
nrotoin		$\pm 0.21^{a}$	$\pm 0.22^{a}$	$\pm 0.20^{a}$	$\pm 0.24^{a}$	±0.23ª	±0.23ª	$\pm 0.20^{a}$	±0.22ª	$\pm 0.22^{a}$	$\pm 0.23^{a}$	±0.24 <sup>a</sup>	±0.22 <sup>a</sup>	
(a (dL)	4	3.03	3.07	3.31	3.01	3.29	3.31	3.15	3.27	3.44	3.41	3.32	3.38	
(g/uL)		$\pm 0.22^{a}$	$\pm 0.21^{a}$	±0.23ª	±0.23ª	±0.23ª	$\pm 0.21^{a}$	±0.22ª	±0.22ª	±0.21ª	$\pm 0.21^{a}$	±0.21ª	±0.23ª	
Total choleste	2	166.75	165.29	163.23	162.74	178.25	180.91	175.92	168.28	189.61	193.10	191.05	194.13	
		$\pm 8.57^{a}$	$\pm 11.64^{a}$	$\pm 7.36^{a}$	$\pm 8.32^{a}$	$\pm 7.63^{ab}$	$\pm 10.79^{ab}$	$\pm 8.32^{ab}$	$\pm 10.21^{a}$	$\pm 8.54^{\rm b}$	±10.99 <sup>b</sup>	$\pm 10.30^{\rm b}$	$\pm 11.36^{b}$	
rol	4	166.34	167.43	165.29	163.77	191.81	190.82	181.03	178.38	196.14	195.25	194.17	193.50	
(mg/dL)		$\pm 10.52^{a}$	$\pm 8.77^{a}$	$\pm 8.08^{a}$	$\pm 8.70^{a}$	$\pm 9.35^{b}$	$\pm 9.36^{\rm b}$	$\pm 9.80^{ab}$	$\pm 11.91^{ab}$	$\pm 10.13^{\rm b}$	$\pm 8.84^{\rm b}$	$\pm 9.37^{\rm b}$	$\pm 10.64^{\rm b}$	

Table. 5. Change of Glucose, Total protein, Total cholesterol in starry flounder, *Platichthys stellatus* combinedly exposed to different concentration of dietary cadmium and L-ascorbyl-2-monophosphate 4 weeks

Values are mean±S.D. Values with a different letter are significantly different from others at 2 weeks and at 4 weeks (P<0.05) as determined by Duncan's multiple range test.

Para meters	Period (weeks)	cadmium, L-ascorbyl-2-monophosphate concentration (mg/kg)											
		C0V0	C0V2	C0V4	C0V8	C4V0	C4V2	C4V4	C4V8	C8V0	C8V2	C8V4	C8V8
GOT (Karmen /ml)	0	25.49	23.61	23.12	23.45	26.65	26.51	25.84	25.75	29.84	29.56	27.41	27.25
	Z	$\pm 1.60^{ab}$	$\pm 1.66^{a}$	$\pm 1.44^{a}$	$\pm 1.38^{a}$	$\pm 1.49^{b}$	±1.36 <sup>b</sup>	$\pm 1.44^{ab}$	$\pm 1.31^{ab}$	$\pm 1.55^{\circ}$	$\pm 1.61^{\circ}$	$\pm 1.43^{\rm bc}$	$\pm 1.54^{\rm bc}$
	4	25.54	23.71	23.62	23.25	26.73	26.54	25.91	25.79	29.92	29.74	29.63	27.52
		$\pm 1.50^{ab}$	$\pm 1.45^{a}$	$\pm 1.58^{a}$	$\pm 1.47^{a}$	$\pm 1.52^{b}$	$\pm 1.46^{\rm b}$	$\pm 1.49^{ab}$	$\pm 1.57^{ab}$	$\pm 1.46^{\circ}$	$\pm 1.56^{\circ}$	$\pm 1.41^{\circ}$	$\pm 1.59^{\rm bc}$
CDT	0	12.33	11.48	10.53	10.73	14.15	13.65	13.54	12.48	16.15	15.71	15.87	14.44
(Karmen /ml)	L	$\pm 1.18^{ab}$	$\pm 0.86^{a}$	$\pm 0.84^{a}$	$\pm 1.03^{a}$	$\pm 1.33^{\rm bc}$	$\pm 1.18^{b}$	$\pm 1.07^{\rm b}$	$\pm 1.13^{\text{ab}}$	$\pm 1.12^{\circ}$	$\pm 1.27^{\circ}$	$\pm 1.11^{\circ}$	$\pm 1.29^{\rm bc}$
	4	12.45	12.54	11.52	10.57	14.46	13.72	13.63	12.57	16.25	15.82	15.78	14.52
		$\pm 1.07^{ab}$	$\pm 1.05^{\text{ab}}$	$\pm 0.92^{a}$	$\pm 0.90^{a}$	$\pm 1.16^{\rm bc}$	$\pm 1.06^{b}$	$\pm 1.12^{b}$	±1.19 <sup>ab</sup>	±1.27°	$\pm 1.20^{\circ}$	±1.23°	$\pm 1.09^{\rm bc}$

Table. 6. Change of GOT, GPT in starry flounder, *Platichthys stellatus* combinedly exposed to different concentration of dietary cadmium and L-ascorbyl-2-monophosphate 4 weeks

Values are mean±S.D. Values with a different letter are significantly different from others at 2 weeks and at 4 weeks (P<0.05) as determined by Duncan's multiple range test.

### 4. 항산화효소 분석

#### 4-1. Superoxide dismutase (SOD)

Cd-AMP 혼합사료 급이에 따른 강도다리의 간, 아가미 내 SOD 활성은 Fig. 6에 나타내었다. 간 내 SOD 활성은 2주차 Cd 40 mg/kg 의 AMP 0, 200 mg/kg에서 유의한 증가를 나타내었지만 AMP 400, 800 mg/kg에서는 유의한 변화를 나타내지 않았고 Cd 80 mg/kg의 모든 AMP 농도 구간에 서 유의한 증가를 나타내었다. 4주차에서는 Cd 40 mg/kg이상에서 유의한 증가를 나타내었고 Cd 80 mg/kg의 AMP 400, 800 mg/kg에서 200, 400 mg/kg 에 비해 유의한 감소를 나타내었다. 아가미 내 SOD 활성은 2주차 Cd 40 mg/kg 의 AMP 0, 200, 400 mg/kg에서 유의한 증가를 나타내었지 만 800 mg/kg에서는 유의한 변화를 나타내지 않았다. Cd 80 mg/kg의 모 든 AMP 농도 구간에서 유의한 증가를 나타내었고 AMP 200, 400, 800 mg/kg에서 0 mg/kg 에 비해 유의한 감소를 나타내었다. 4주차에서는 Cd 40 mg/kg이상에서 유의한 증가를 나타내었다. Cd 40 mg/kg의 AMP 800 mg/kg에서 0, 200, 400 mg/kg 에 비해 유의한 감소를 나타내었고 Cd 80 mg/kg에서 0, 200, 400 mg/kg 에 비해 유의한 감소를 나타내었고 Cd 80 mg/kg에서 0, 200, 400 mg/kg 에 비해 유의한 감소를 나타내었고 Cd 80 mg/kg의 AMP 400, 800 mg/kg에서 100, 200 mg/kg 에 비해 유의한 감소 를 나타내었다.



Fig. 6. SOD activity of starry flounder, *Platichthys stellatus* combinedly exposed to the different concentration of dietary cadmium and L-Ascorbyl-2-monophospate for 4 weeks. Values with different superscript are significantly different in 2 and 4 weeks (P < 0.05) as determined by Duncan's multiple range test.

#### 4-2. Catalase (CAT)

Cd-AMP 혼합사료 급이에 따른 강도다리의 간, 아가미 내 CAT 활성은 Fig. 7에 나타내었다. 간 내 CAT 활성은 2, 4주차 Cd 40 mg/kg 의 AMP 0, 200, 400 mg/kg에서 유의한 증가를 나타내었지만 AMP 800 mg/kg에서 는 유의한 변화를 나타내지 않았고 Cd 80 mg/kg의 모든 AMP 농도 구간 에서 유의한 증가를 나타내었다. 아가미 내 CAT 활성은 2주차 Cd 40 mg/kg 의 AMP 0, 200 mg/kg에서 유의한 증가를 나타냈지만 AMP 400, 800 mg/kg에서는 유의한 변화를 나타내지 않았고 Cd 80 mg/kg의 모든 AMP 농도 구간에서 유의한 증가를 나타내었다. 4주차에서는 Cd 40 mg/kg 의 AMP 0, 200, 400 mg/kg에서 유의한 증가를 나타냈지만 AMP 800 mg/kg에서는 유의한 변화를 나타내지 않았고 Cd 80 mg/kg의 모든 AMP 농도 구간에서 유의한 변화를 나타내지 않았고 Cd 80 mg/kg의 모든



Fig. 7. CAT activity of starry flounder, *Platichthys stellatus* combinedly exposed to the different concentration of dietary cadmium and L-Ascorbyl-2-monophospate for 4 weeks. Values with different superscript are significantly different in 2 and 4 weeks (P < 0.05) as determined by Duncan's multiple range test.

#### 4-3. Glutathione s-transferase (GST)

Cd-AMP 혼합사료 급이에 따른 강도다리의 간, 아가미 내 GST 활성은 Fig. 8에 나타내었다. 간 내 GST 활성은 2주차 Cd 40 mg/kg 의 AMP 0, 200 mg/kg에서 유의한 증가를 나타냈지만 AMP 400, 800 mg/kg에서는 유의한 변화를 나타내지 않았고 Cd 80 mg/kg의 모든 AMP 농도 구간에 서 유의한 증가를 나타내었다. 4주차에서는 Cd 40 mg/kg이상에서 유의한 증가를 나타내었지만 Cd 80 mg/kg의 AMP 400, 800 mg/kg에서 AMP 0, 200 mg/kg에 비해 유의한 감소를 나타내었다. 아가미 내 GST 활성은 2주 차 Cd 40 mg/kg 의 AMP 0, 200 mg/kg에서 유의한 증가를 나타냈지만 AMP 400, 800 mg/kg에서는 유의한 변화를 나타내지 않았고 Cd 80 mg/kg의 모든 AMP 농도 구간에서 유의한 증가를 나타내었다. 4주차에서 는 Cd 40 mg/kg 의 AMP 0, 200, 400 mg/kg에서 유의한 증가를 나타냈 지만 AMP 800 mg/kg에서는 유의한 변화를 나타내지 않았고 Cd 80 mg/kg의 모든 AMP 농도 구간에서 유의한 증가를 나타내지 않았고 Cd 80

A SI CH OL W



Fig. 8. GST activity of starry flounder, *Platichthys stellatus* combinedly exposed to the different concentration of dietary cadmium and L-Ascorbyl-2-monophospate for 4 weeks. Values with different superscript are significantly different in 2 and 4 weeks (P < 0.05) as determined by Duncan's multiple range test.

#### 4-4. Glutathione (GSH)

Cd-AMP 혼합사료 급이에 따른 강도다리의 간, 아가미 내 GSH 활성은 Fig. 8에 나타내었다. 간 내 GSH 활성은 2주차 Cd 40 mg/kg 의 AMP 0, 200, 400 mg/kg에서 유의한 증가를 나타냈지만 AMP 800 mg/kg에서는 유의한 변화를 나타내지 않았고 Cd 80 mg/kg의 모든 AMP 농도 구간에 서 유의한 증가를 나타내었다. 4주차 또한 Cd 40 mg/kg 의 AMP 0, 200, 400 mg/kg에서 유의한 증가를 나타냈지만 AMP 800 mg/kg에서는 유의한 변화를 나타내지 않았고 Cd 80 mg/kg의 모든 AMP 농도 구간에서 유의 한 증가를 나타냈지만 Cd 80 mg/kg의 AMP 200, 400, 800 mg/kg에서 AMP 0 mg/kg에 비해 유의한 감소를 나타냈다. 아가미 내 GSH 활성은 2, 4주차 Cd 40 mg/kg 의 AMP 0, 200, 400 mg/kg에서 유의한 증가를 나타 냈지만 AMP 800 mg/kg에서는 유의한 변화를 나타내지 않았고 Cd 80 mg/kg의 모든 AMP 농도 구간에서 유의한 증가를 나타내었다.

CH OL M

AT 23



Fig. 9. GSH level of starry flounder, *Platichthys stellatus* combinedly exposed to the different concentration of dietary cadmium and L-Ascorbyl-2-monophospate for 4 weeks. Values with different superscript are significantly different in 2 and 4 weeks (P < 0.05) as determined by Duncan's multiple range test.

## Ⅳ.고 찰

오염된 수중 생태계에서 퇴적물 내 카드뮴 함량은 일반적으로 수중 카드 뮴 함량보다 높다. 퇴적물에서 저서생물로의 카드뮴 이동은 카드뮴의 유해 한 축적을 유발할 수 있으며(Farag AM at al., 1994) 이것은 먹이사슬 상 위단계로 갈수록 더 심한 축적을 유발한다(Barletta et al. 2012). 실제로 금 속으로 오염된 저질에 서식하는 무척추 동물을 먹이로 하는 어류는 각 조 직에 다량의 금속이 축적된 연구 결과가 있다(Woodward DF at al., 1995). 어류는 아가미, 소화관 및 체표를 통해서 금속을 흡수하며(Tao et al., 2001; Kamunde et al., 2002), 축적에 따른 체내 분포는 섭취 경로에 따라 달라질 수 있으며(Mai, K at al, 2006) 또한 조직에서의 축적은 노출농도, 노출기간 뿐만 아니라 염분, 온도, 상호작용 요소, 조직의 대사활동에 따라 달라진다(Heath, 1995; Ay et al., 1999). 이러한 체내 축적에 따른 영향은 표피, 아가미, 간, 비장, 및 신장의 조직병리학적 변화뿐만 아니라 성장 및 생식 장애를 유발할 수 있다(Vitek et al. 2007). 많은 연구에 따르면 수중 카드뮴 노출에 따른 주요 축적 조직은 아가미, 신장, 간이였지만(Olsson & Haux 1996; Dai, Zheng, Hong & Liu 1997; De Conto Cinier et al. 1999), 급이식 카드뮴 노출의 경우 해독 기관인 간, 신장과 더불어 장에서 높은 축적을 보였으며(Berntssen et al. 2001), 축적량은 독성 영향과 상관 관계 를 나타내었다(McGeer et al., 2012).

본 연구에서 사용한 어종 강도다리는 가자미과 저서성 어류로써 침강사료 에 포함된 카드뮴 농도에 따른 조직별 유의한 축적을 나타내었다. Cd-AMP 혼합사료 급이에 따른 강도다리의 가장 높은 축적을 보인 조직 은 장이었다. 다른 연구결과 중 급이식 카드뮴에 따른 Oncorhynchus

mykiss(Szebedinszky, C, 2001)와 Salmo salar(Berntssen et al. 2001)의 기 관별 축적에 있어서 장이 가장 높은 축적을 나타냈으며 Thomann RV at al.(1997)는 이러한 식이로부터의 카드뮴의 흡수는 소화관으로 전달 후 혈 액으로 이동하고 수송단백질과 결합하여 순환을 통해 다양한 조직에 분포 될 수 있다고 보고하였다.

장 다음으로는 간에서 높은 축적을 나타냈다. 간은 환경독성 화합물에 의 한 조직 손상을 분석하기 위해 주로 이용되는 장기이며(Amaral et al. 2002) 급이식 카드뮴의 간 내 축적은 소화관으로부터 간문맥계를 통해 간 까지 지속적인 이동이 있었음을 나타낸다(Handy,1996). 간은 일반적으로 카드뮴 노출 시, 어류 내 높은 축적을 나타내며 metallothionein 유도와 카 드뮴의 MTLP (metallothionein-like protein)로의 재분배에 있어서 중요한 기관이다(Dang, F., & Wang, W. X., 2009). 따라서 본 연구에서도 카드뮴 축적에 따른 해독의 주요 기관인 간에서 높은 축적을 나타났다고 판단되어 진다. 다른 해독기관으로써 신장은 카드뮴 제거에 중심역할을 하며, 카드뮴 은 아치사 농도에서 신장조직에 선택적으로 축적되기 때문에 신장 유독성 물질(nephrotoxicant)로 알려져 있다(Kumada et al., 1980). 본 연구에서 또 한 신장에서 높은 축적을 나타냈으며, Reynders et al. (2008)의 연구 결과 에 따르면 Cyprinus carpio와 Rutilus rutilus의 신장에서 다른 조직에 비해 높은 축적을 나타냈다. Kuroshima (1987)는 카드뮴은 근육과 같은 조직 내 의 리간드(ligand)에는 약하게 결합하지만 간, 신장조직의 리간드에서는 강 하게 결합될 수 있으며 체내 제거를 위한 해독작용의 목적으로 다른 조직 으로부터 카드뮴을 전달받을 수 있기 때문에 높은 축적이 나타날 수 있다 고 보고하였다. 어류에 있어서 비장은 중요한 면역·조혈기관이며(Zheng, J. L. at al., 2011) 높은 대사활동으로 다른 조직에 비해 많은 양의 금속이 축 적될 수 있다(Shukla et al., 2007). 본 연구에서도 비장에서 카드뮴의 유의

한 축적을 나타냈으며, P. Allen (1994)의 연구 결과에서도 역시 수은 존재 하에 비장에서의 높은 카드뮴 축적을 나타냈다. 경골어류의 아가미는 이온 조절, 가스교환, 산-염기 균형, 질산성 노폐물 배출에 중요한 역할을 함으 로써 수계환경과 상호작용하며(Kim, S. G. at al., 2006), 식이와 더불어 독 성물질의 축적에 주요한 영향을 미치는 조직이다(Kim and Kang, 2014). 식이를 통해 체내로 유입된 카드뮴은 장에서 흡수되어 순환계를 통해 아가 미에 전달되어 상당한 손상을 줄 수 있으며 결과적으로 삼투압 조절능력을 감소시킬 수 있다(Pratap and Wendelaar Bonga, 1993). 일반적으로 금속의 수중 노출에 의한 축적은 장보다 아가미에서 높은 축적이 나타난다. 금속 의 급이식 노출인 본 연구에서 아가미는 카드뮴의 유의한 축적이 관찰되었 지만 장에 비해서는 낮은 축적을 나타냈다. 다른 연구 결과로 Sebastes 납 노출과(Kim and Kang, 2014), Pomadasys schlegelii의 급이식 argenteus, Parapristipoma trilineatum의 급이식 카드뮴 노출(Fei Dang, Wen-Xiong Wang, 2009)에서도 아가미에 비해 장에서 높은 축적을 나타 내었다. 어체에서 근육은 인간이 주로 섭취하는 조직이기 때문에 근육의 금속 축적은 매우 중요한 요소이다(Cinier et al., 1999). 본 연구에서 근육 은 2, 4주차 Cd 80 mg/kg 의 AMP 0 mg/kg 구간을 제외한 다른 구간에 서는 유의한 변화가 관찰되지 않았다. 다른 연구결과에 의하면 카드뮴 수 중 노출에 따른 Cyprinus carpio의 근육에서 다른 주요 장기에 비해 낮은 축적을 나타내었고(de Conto Cinier, C. at al, 1999), 카드뮴 급이식 노출에 따른 Cyprinus carpio의 근육 또한 다른 장기에 비해 낮은 축적을 나타내 었다(Kraal, M. H., 1995). 또한 Pseudoplatystoma corruscans의 근육에서 낮은 축적이 보고된 바 있다(Arantes, F. P. at al., 2016). 본 연구에서 Cd-AMP 혼합사료 급이에 따른 강도다리의 카드뮴 축적량은 장〉간〉신 장〉비장〉아가미〉근육 순이었으며 AMP 첨가는 모든 장기에서 유의한

영향을 나타내었다. AsA는 금속축적에 영향을 미치는 영양소 중 하나로써 금속의 독성효과를 감소시키고 위장관에서의 카드뮴 흡수를 저해시킬 수 있다. AsA의 장에서의 기작은 제 2철 이온(Fe<sup>3+</sup>)을 제1철 이온(Fe<sup>2+</sup>)으로 환원시킴으로써 철분 흡수를 크게 자극하며 이것은 철이온과 카드뮴 이온 이 흡수되는 경쟁 과정에서 카드뮴의 흡수를 저하시킨다(Hudecova, A. at al., 1992). 또한 고농도의 AsA 섭취는 조직내 metallothionein(MT) 농도를 상승시킬 수 있다(Onosaka, S. at al., 1987). MT은 카드뮴의 운송 및 독성 효과의 방어에 중요한 sulfhydryl(SH) group이 풍부한 저분자량 단백질로 써 AsA은 MT의 SH-group이 비기능적인 disulfide group으로 산화되는 것을 막는 항산화제로써 작용한다. 또한 중금속의 양이온과 복합체를 형성 하여 카드뮴의 독성을 감소시키거나 유기체로부터 카드뮴 제거를 촉진시킬 수 있다(Lewin, S., 1976). 그리고 만성노출 동안 다량의 금속은 GSH과 결 합하여 답즙으로 분비될 수 있는데 GSH는 합성시 AsA을 필요로 한다 (Cherian and Vostal, 1977; Arizono et al., 1995). Kumar et al. (2009)의 연구 결과에 의하면 AsA 첨가와 함께 카드뮴에 노출된 Clarias batrachus 의 간, 신장은 단독으로 카드뮴에만 노출됐을 때보다 훨씬 적은 카드뮴 축 적을 나타내었다. Wang, J. at al (2016)의 연구에서 또한 AsA이 첨가된 Apostichopus japonicus의 조직 내에서 카드뮴 축적의 감소가 보고된 바 있다.

어류의 성장은 만성 독성 연구에서 일반적으로 사용되는 민감하고 신뢰할 수 있는 biomarker이며(De Boeck et al.,1997), 간중량지수(hepatosometic index) 또한 금속 노출에 따른 독성을 평가하는데 중요한 지표로 사용된다 (Datta et al., 2007). Messaoudi, I.(2009)의 연구에서는 카드뮴 노출에 의해 *Salaria basilisca*의 간중량 지수의 감소를 나타내었다. 금속에 노출 시, 생 물은 독성영향에 따른 신진대사로 인해 성장률이 떨어질 수 있지만

(Collvin, 1985), 이러한 독성에 따른 해독물질인 AsA은 성장과 발달에 있 어서 필수적인 영양소이며, AsA 요구량은 생물의 종, 크기, 환경, 건강상태 에 따라 다양하다. 본 연구에서 Cd-AMP 혼합사료 급이에 따른 강도다리 의 성장은 카드뮴 해독으로 인한 진신대사의 변화로 인해 유의한 감소를 나타냈지만 AMP 첨가는 성장률과 간중량지수의 감소를 완화시켰다. Abdel-Tawwab, M.(2004)의 연구 결과에서 수은에 노출된 Oreochromis niloticus는 급이식 AsA 첨가에 의해 성장의 회복을 타나내었다. 그리고 Wang, J. at al.,(2016)의 연구 결과 또한 카드뮴에 노출된 Apostichopus japonicus의 급이식 AsA 첨가에 의해 성장의 회복을 나타내었다.

혈액학적 성상의 분석은 오염물질의 아만성 노출에 따른 독성영향농도를 정하기 위해 어류의 생리학적 임상진단 방법으로써 주로 사용된다(Romani et al., 2003; Barcellos et al., 2004). 금속독성의 지표로써 혈액학적 요소의 변화는 환경의 변화에 따른 어류의 ion concentration, glucose, Plasma hormone, hemoglobin, hematocrit value 등의 생리학적 반응에 대한 정보 를 제공 할 수 있다(Haux & Larsson1984; Dethlo, Bailey & Maier 2001; Smet & Blust 2001). 본 연구에서 급이식 카드뮴 노출에 따른 영향은 강 도다리의 RBC count, hematocrit value, hemoglobin concentration 와 같은 혈액학적 요소의 유의한 감소를 나타냈지만, 높은 농도의 AMP 첨가는 카 드뮴 독성에 따른 혈액학적 요소의 변화를 완화시켰다. 다른 많은 연구에 서 또한 금속 독성에 따른 혈액학적 요소의 감소를 나타내었다. 급이식 카 드뮴 독성의 영향으로 Sebastes schlegelii은 haemoglobin, haematocrit concentration의 감소를 나타냈고(Kim, S. G at al., 2004), Oreochromis niloticus에 대한 카드뮴 독성에서 또한 RBC count, hematocrit value, hemoglobin concentration의 감소를 나타내었다(Al-Attar, A. M., 2005). Karuppasamy et al.(2005)의 연구에서는 카드뮴 노출에 따른 Anguilla

rostrata의 RBC count, hematocrit value, hemoglobin concentration 의 감 소가 나타난 바 있다. 중금속과 같은 독성 노출은 일반적으로 수생 동물에 서 적혈구 용혈을 유도하며, 이것은 변형된 적혈구와 빈혈현상 이외에 hemoglobin 및 hematocrit value의 변화를 유도할 수 있다(Maheswaran et al., 2008). 카드뮴이 흡수되면 적혈구에서 순환하거나 알부민에 결합할 수 있으며 (Klaaassen CD, 1999), 아치사 수준의 카드뮴 농도에 따른 혈액학 적 성분의 감소는 성숙한 적혈구의 파괴와 적혈구 생성의 억제로 인한 결 과 일 수 있다(Wintrobe 1978; Khadre 1988; Mekkawy, I. A. 2011). 카드 뮴에 의해 유발된 혈액학적 요소 수준의 감소는 혈액 세포 내부와 외부의 삼투압에 의한 불균형으로도 발생한다(Heath 1995). 혈장 내 무기물 중 칼 슘과 마그네슘은 항상성을 위한 이온 조절의 기능으로 인해 금속 독성을 평가하는 주요 지표이다(Kim and Kang, 2014). 카드뮴은 Ca<sup>2+</sup> 섭취 및 수 송 메커니즘을 통해 장으로부터 흡수 될 수 있으며 Ca<sup>2+</sup> 결합 부위에서 Ca<sup>2+</sup>과 직접적으로 경쟁함으로 인해 저칼슘혈증 및 저칼륨혈증, 고혈당을 일으킬 수 있고 호흡기능 및 혈장 성분에 영향을 미칠 수 있다(Sorensen, 1991). Pratap HB at al(1989)의 연구결과에서는 급이식 카드뮴에 따른 Oreochromis mossambicus에서 저칼슘혈증이 나타난 바 있다. 본 연구에 서는 유기 성분인 글루코즈, 콜레스테롤, 총단백 중 급이식 카드뮴 노출에 따른 글루코즈와 콜레스테롤은 유의한 증가를 나타낸 반면, 총단백은 유의 한 변화를 나타내지 않았다. 혈중 글루코즈 수준의 변화는 스트레스 지표 로 알려져 있으며 정상수준보다 높은 수치는 스트레스에 따른 생체의 방어 기작을 의미한다(Barton, 2002). 카드뮴은 포도당신생합성 및 해당과정과 같은 탄수화물 신진대사의 역할을 하는 간 효소의 활성에 영향을 주어 어 류의 글리코겐 축적량과 혈중 글루코즈 수준을 변화시킬 수 있다 (Levesque, H. M., 2002). CiCiK, B.(2005)의 연구 결과에서는 카드뮴 노출

에 따른 Cyprinus carpio의 혈중 내 글루코즈 수준이 증가했으며 Hilmy, A.M.(1987)의 연구에서 또한 카드뮴 노출에 따른 Mugil cephalus의 혈중 내 글루코즈 수준의 증가를 나타내었다. 콜레스테롤은 plasma lipoprotein 외층 요소일 뿐만 아니라 세포막의 구조적 필수 구성요소이며, 스테로이드 호르몬의 전구체이다(Yang and Chen 2003). 간 및 신부전은 혈액 내로 콜 레스테롤의 방출을 야기 할 수 있고 이것은 혈중 콜레스테롤 농도를 증가 시킨다. 중금속은 세포구조, 특히 세포막에 유해한 영향을 미치는 것으로 알려져 있기 때문에 혈중 내 콜레스테롤의 증가는 환경 스트레스의 지표가 될 수 있다(Öner, M., 2008). Joshi, P. K.(2002)의 연구결과에서는 카드뮴 노출에 따른 Clarias batrachus의 혈액에서 콜레스테롤의 증가가 나타난 바 있다. 혈장 총단백 수준은 어류의 간 상태와 혈류 농도를 나타내는 지 표 역할을 한다(Mirghaed, A. T. at al., 2017). 하지만 급이식 카드뮴 노출 에 따른 강도다리의 혈장에 있어서는 유의한 변화가 나타나지 않았다. 혈 청 내 glutamic acidoxaloacetic acid-transaminase (GOT)와 glutamic acid-pyruvic acidtransaminase (GPT)는 의학 및 임상진단에 있어서 중요 하며 다양한 오염 물질의 독성 영향을 감지하는데 사용된다 (Nelson and Cox, 2000). GOT, GPT는 간에 풍부한 효소로써, 간의 손상시 다량이 핼액 으로 유리되어 나올 수 있다(Wu, J. P. at al., 2008). 본 연구에서 급이식 카드뮴 노출에 따른 강도다리의 혈청 내 GOT, GPT는 유의한 증가를 나 타내었다. Wu, J. P. at al(2008)의 연구 결과에서는 카드뮴 노출에 의한 Litopenaeus vannamei 의 hemolymphatic GOT 와 GPT 활성의 증가를 나타내었다. 또한 Žikić RV at al.(2001)의 연구 결과에서도 Carassius auratus 혈중 내의 카드뮴은 GOT, GPT 의 활성을 유의하게 증가 시켰다. 급이식 카드뮴 노출에 따른 영향으로 강도다리의 RBC count, hematocrit value, hemaglobin 및 혈청 내 무기물, 유기물, 효소성분은 유의한 변화를

나타내었으며 AMP 첨가는 급이식 카드뮴 노출에 따른 변화를 효과적으로 완화시켰다. Hounkpatin at al (2003)의 연구에서는 vitamin C, vitamin E 로 전처리 된 쥐에서 혈액요소의 독성 및 지질 과산화물에 따른 독성의 완 화를 나타내었다. 또한 Borane, V. R. (2013)의 연구에서 카드뮴에 노출된 *Channa orientalis*의 AsA 첨가는 단독으로 카드뮴에만 노출되었을 때에 비해 혈액학적 성분에 대한 카드뮴 독성이 현저히 완화되었다.

금속은 잘 알려진 산화스트레스 유발인자이며, 금속에 의한 어류의 산화 적 손상 및 항산화 방어의 평가는 수생환경의 금속 오염을 반영 할 수 있 는 지표가 될 수 있다(Livingstone, 2003). 산화 스트레스는 reactive oxygen species(ROS) 생성속도가 제거속도를 초과 할 때 발생한다(Sies, 1986). 카드뮴은 미토콘드리아 막 투과성에 영향을 미치고, 호흡연쇄반응을 억제하며 이것은 곧 세포에서 ROS의 생성으로 이어지는데(Dorta et al., 2003) 산화 스트레스 유도 효과와 관련하여 Cd<sup>2+</sup> 자체는 직접적으로 자유 라디칼을 발생시키지 못하나 간접적으로 superoxide radical, hydroxyl radical을 발생시키며(Galan et al., 2001), superoxide anion(O<sup>2-</sup>), hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), hydroxyl radical (HO<sup>-</sup>) 과 같은 ROS 형성을 유도함으로 써 산화 스트레스 촉진제로 알려져 있다(Tamás et al., 2009). ROS의 생성 증가는 단백질 및 지질의 산화, 유전자 발현의 변화, 세포의 산화-환원 상 태의 변화를 일으킬 수 있으며(Livingstone, 2003), DNA 손상과 세포 괴사 를 일으킨다(Liu et al., 2009). 이러한 스트레스에 대응하여 생물체는 산화 스트레스를 유발하는 중금속과 다른 xenobiotics로부터 스스로를 보호하기 위한 방어기작을 가지고 있는데(Basha, P. S., & Rani, A. U., 2003), 자유 라디칼에 의해 발생된 유해한 산화과정으로부터 생체를 보호하기 위해 세 포에는 효소 및 비효소적 방어기작이 존재한다(Droge, 2002; Halliwell and Gutteridge, 2007). 방어기작의 구성요소에는 항산화 효소인 superoxide

dismutase(SOD), catalase(CAT), glutathione peroxidase (GPx). glutathione-s-transferase(GST) (Halliwell and Gutteridge, 2007; Matés, 2000; Sevcikova, M. at al, 2011)와 항산화 방어에 핵심적인 역할을 하는 Reduced glutathione(GSH), oxidized glutathione disulphide(GSSG)가 있으 며(Sevcikova, M. at al., 2011) 항산화 효소의 기능에 필수적인 외인성 항 산화물질인 ascorbate(Vitamin C), tocopherols (Vitamin E), Vitamin A, carotenoids, 일부금속 등이 있다(Chen and Tappel, 1995; Halliwell and Gutteridge, 2007; Tandon et al., 2003). 이 중 Vitamin C(L-ascorbic acid, AsA)은 수생동물의 정상적인 생리적 과정을 유지하는데 필수 요소로써 어 류를 비롯한 동물에서 금속의 유전 독성 영향을 최소화 할 수 있으며, 면 역력을 증가 시킴으로써 중금속에 대한 유해한 영향을 막을 수 있다 (Jiraungkoorskul and Sahaphong, 2007; El-Greisy and El-Gamal, 2015). 따라서 비정상적으로 생성된 대부분의 ROS는 자기방어 시스템, 항산화 효 소 및 glutathione(GSH) 과 같은 free antioxidant에 의해 중화될 수 있다 (Kim, J. H. at al., 2010).

산화 스트레스에 대한 첫 번째 방어기작으로 SOD-CAT system이 존재 한다(Messaoudi, I. at al., 2009). 두 효소는 산화 스트레스에 대한 첫 번째 방어기작으로 함께 작용하며(Asagba et al., 2008), 금속 노출 시 생물의 종, 투여량, 노출경로에 따라 유도 되거나 억제 될 수 있다(Romeo' et al., 2000; Atli et al., 2006). 이중 SOD는 ROS에 대한 첫 번째 방어기작으로써 superoxide anion을 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>로 전환시키는 불균등화 반응을 촉매시킨다(Shao et al., 2012). 이어서 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>는 CAT에 의해 H<sub>2</sub>O 및 O<sub>2</sub> 로 분해된다. 본 연 구에서 급이식 카드뮴 노출에 따른 강도다리의 간 및 아가미 SOD 활성은 유의한 증가를 나타냈으며, CAT 또한 유의한 증가를 나타냈다. 항산화 효 소 활성은 카드뮴 영향에 의해 증가된 산화 스트레스와 연관이 있으며

(Atli et al., 2006), SOD의 활성 증가는 superoxide anion radical 생성의 증가로 인한 것으로 판단되며 CAT 활성 증가 또한 다량의 H2O2의 생성으 로 인한 결과로 판단된다. Fang et al. (2010)의 연구결과에 따르면 수중 카드뮴에 노출된 Mactra veneriformis에서 SOD 증가를 나타냈으며 Basha, P. S., & Rani, A. U. (2003)의 연구결과에서 또한 Oreochromis mossambicus의 간에서 SOD의 증가를 나타내었다. CAT에 대한 다른 연 구결과로는 수중 카드뮴에 노출된 Salmo trutta의 아가미에서 CAT 증가 를 나타냈으며(Hansen et al. ,2007), 수중 카드뮴에 노출된 Sparus aurata 의 간에서 또한 CAT 증가를 나타내었다(Pascual, P., 2003). Glutathione S-transferase(GST)는 GSH와의 결합을 통해 내인성(세포 내 대사 물질) 및 외인성 물질의 해독에 관여하는 다기능 이합체 효소이며, 반응성 지방 친화성 분자를 세포 밖으로 배출될 수 있는 수용성-비반응성 접합체로 전 환시킨다(Hayes and Pulford, 1995). 본 연구에서 급이식 카드뮴 노출에 따 른 강도다리의 간 및 아가미의 GST 활성은 증가하였다. GST 활성 증가 는 카드뮴의 조직 침투에 따른 간 해독 능력의 증가에 해당하며 이것은 ROS 에 대한 방어기작으로 판단되어진다. Mohamed, S. at al (2008)의 연 구결과에 의하면 Gambusia affinis의 간에서 GST 활성 증가를 나타냈으며 Basha, P. S., & Rani, A. U. (2003)의 연구결과 또한 Oreochromis mossambicus의 간에서 GST 활성 증가를 나타내었다. GSH는 효과적인 항산화제로써, 산화 스트레스를 유발하는 금속과 결합 할 수 있으며, 이 과 정에서 GSH는 ROS에 의해 산화되어 disulfide(GSSG)형태로 전환되지만 glutathione reductase(GR)에 의해 다시 GSH로 전환된다(Stohs and Bagchi, 1995). 본 연구에서 급이식 카드뮴 노출에 따른 강도다리의 간 및 아가미 GSH level은 증가를 나타냈으며 Dabas, A.(2012)의 연구결과에 또 한 카드뮴 노출에 의해 Channa punctatus의 간에서 GSH level의 증가를

나타내었다. Schlenk and Rice (1998)은 GSH, metallothionein과 같은 cytosolic thiol-rich protein은 카드뮴과 결합하여 세포 내 카드뮴의 감소상 태를 유지함으로써 2차적 산화 스트레스를 방어 할 수 있다고 보고하였다. AsA는 신속한 전자 전달에 의해 ROS를 제거하여 세포 내 산화-환원 균 형을 유지함으로써 지질과 같은 거대분자, DNA, 일부 질병과 연관된 단백 질에 영향을 줄 수 있는 ROS의 악영향을 감소 시킬 수 있다(Shaban ElNeweshy and Said El-Sayed 2011; You et al. 2000). 따라서 AsA첨가 는 자유라디칼의 자동산화 연쇄반응을 막음으로써 체내 중금속에 의한 독 성효과를 감소시킬 수 있다(Sayeed et al., 2003). 본 연구에서 AMP의 첨 가는 강도다리의 굽이식 카드뮴 노출에 따른 항산화 효소 활성을 현저히 완화시켰다. Yadav, S. S. at al (2015) 의 연구결과에서 불소에 노출된 *Heteropneustes fossilis*의 AsA 첨가는 불소에만 노출되었을 때에 비해 간 에서의 SOD, CAT, GST의 활성이 현저히 완화되었고 이것은 AsA에 의 한 ROS의 감소로 인해 SOD 및 CAT 활성이 저하 된 것으로 판단되어진 다.

본 연구에서는 강도다리의 급이식 카드뮴 노출에 따른 AMP의 체내 보호 기능과 해독 효과를 중점적으로 평가했다. 전반적으로 강도다리의 급이식 카드뮴 노출은 체내 여러 구성요소의 유의한 변화를 유도했으며, 높은 수 준의 AMP 첨가는 이러한 독성반응을 유의적으로 완화시켰다. 따라서 본 연구 결과는 강도다리의 카드뮴 축적에 따른 AMP의 긍적적인 효과를 평 가하기 위한 데이터로써 활용 될 수 있다고 판단되어진다. 하지만 독성물 질의 종류, 농도 및 어종 그리고 환경에 따라 그 영향은 다르게 나타날 수 있기 때문에 향 후 다양한 요소에 따른 복합적인 연구가 추가적으로 계속 이루어져야 할 것으로 사료된다.

요 약

카드뮴 노출에 따른 강도다리의 독성영향에 대한 비타민 C 유도체인 L-Ascorbyl-2-monophospate(AMP) 의 해독효과를 확인하기 위해, 강도다 리(평균 전장 19.87±0.21 cm, 평균 체중 139.47±1.41 g)를 카드뮴 0, 40, 80 mg/kg 농도와 AMP 0, 200, 400, 800 mg/kg 의 농도로 설정하여 사료를 통한 급이 방법으로 총 4주간 노출시켰다. 카드뮴 노출농도와 기간은 각 장기에 유의한 축적을 나타내었다. 장 조직에서 가장 높은 축적을 나타내 었고 AMP 투여농도에 따라 특정조직에서의 카드뮴 축적은 유의한 감소를 나타내었다. 성장에서는 카드뮴 노출에 따른 강도다리의 유의한 감소를 나 타내었다. RBC count, hematocrit value, hemoglobin concentration 등과 같은 혈액학적 성상에서는 카드뮴 노출에 따른 유의한 감소를 나타내었고, 혈액 성분에서는 무기성분인 칼슘, 마그네슘과 유기성분인 클루코즈, 콜레 스테롤 그리고 효소 GOT, GPT의 유의한 변화를 나타내었지만 총단백질 에서는 유의한 변화를 나타내지 않았다. 카드뮴 노출은 강도다리의 성장과 혈액학적 요소에서 유의한 변화를 나타내었고 높은 수준의 AMP 투여는 카드뮴 노출에 따른 독성을 완화시키는데 효과적이었다. 간, 아가미의 항산 화 효소활성은 급이식 카드뮴 노출에 따른 산화스트레스 지표로 평가되었 다. SOD, CAT, GST, GSH는 유의한 증가를 나타내었다. 산화스트레스에 따른 항산화반응에서 항산화물질 AMP는 카드뮴 노출에 따른 항산화반응 을 유의적으로 완화시켰다.

# 참 고 문 헌

- Andre´asson M, Dave G. 1995. Transfer of heavy metals from sediment to fish, and their biliary excretion. J Aquat Ecosystem Health 4:221 -230.
- AMARAL AF, ALVARADO N, MARIGÓMEZ I, CUNHA R, HYLLAND K AND SOTO M. 2002. Autometallography and metallothionein immunohistochemistry in hepatocytes of turbot (Scophthalmus maximus l.) after exposure to Cd and further depuration treatment. Biomarkers 7: 491–500.
- Abdel-Tawwab, M., Shalaby, A. M., Ahmad, M. H., & Khattab, Y. A.
  (2004). EFFECT OF SUPPLEMENTAL DIETARY L-ASCORBIC
  ACID (VITAMIN C) ON MERCURY DETOXICATION,
  PHYSIOLOGICAL ASPECTS AND GROWTH PERFORMANCE OF
  NILE TILAPIA (Oreochromis niloticus L.). Annals of Agricult. Sci,
  39(2), 883–895.
- Abou EL-Naga, E. H.; EL-Moselhy, K. M.; Hamed, M. A.,(2005). Toxicity of cadmium and copper and their effect on some biochemical parameters of marine fish Mugil seheli. Egyptian. J. Aquat. Res., 31 (2), 60–71.

- Atli, G, Canli, M. Responses of metallothionein and reduced glutathione in a freshwater fish Oreochromis niloticus following metal exposures. Environ Toxicol Pharmacol 2008; 25: 33 - 38.
- Atli, G., & Canli, M. (2010). Response of antioxidant system of freshwater fish Oreochromis niloticus to acute and chronic metal (Cd, Cu, Cr, Zn, Fe) exposures. Ecotoxicology and Environmental Safety, 73(8), 1884–1889.
- Atli G, Alptekin <sup>¬</sup>I, Tukel S, Canli M, 2006. Response of catalase <sup>¬</sup> activity to Ag+, Cd2+, Cr6+, Cu2+ and Zn2+ in five tissues of freshwater fish Oreochromis niloticus. Comparative Biochemistry and Physiology, 143: 218 224.
- Agrawal, N.K., Juneja, C.J., Mahajan, C.L., 1978. Protective role of ascorbic acid in fishes exposed to organochlorine pollution. Toxicology 11, 369 375.
- Ai, Q.,Mai, K., Tan, B., Xu,W., Zhang, W.,Ma, H., Liufu, Z., 2006. Effects of dietary vitamin C on survival, growth, and immunity of large yellow croaker, Pseudosciaena crocea. Aquaculture 261, 327 - 336.
- Al-Attar, A. M. (2005). Changes in haematological parameters of the fish, Oreochromis niloticus treated with sublethal concentration of cadmium. Pakistan Journal of Biological Sciences, 8(3), 421–424.

- Asagba, S.O., Eriyamremu, G.E., Igberaese, M.E., 2008. Bioaccumulation of cadmium and its biochemical effect on selected tissues of the catfish (Clarias gariepinus). Fish Physiol. Biochem. 34, 61 - 69.
- Berntssen, M.H.G., Aspholm, O.Ø., Hylland, K., Wendelaar Bonga, S.E. & Lundebye, A.K. (2001) Tissue metallothionein, apoptosis and cell proliferation responses in Atlantic salmon (Salmon salar L.) parr fed elevated dietary cadmium. Comparative Biochemistry and Physiology Part C 128, 299 - 310.
- Beyers, D.W., Rice, J.A., Clements, W.H., Henry, C.J., 1999.Estimating physiological cost of chemical exposure: integrating energetics and stress to quantify toxic effects in fish. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 56, 814 822
- Baldisserotto, B., Chowdhury, M.J., Wood, C.M., 2004a. Effects of dietary calcium and cadmium on cadmium accumulation, calcium and cadmium uptake from the water, and their interactions in rainbow trout. Aquat. Toxicol. (in press).
- Baldisserotto, B., Chowdhury, M. J., & Wood, C. M. (2005). Effects of dietary calcium and cadmium on cadmium accumulation, calcium and cadmium uptake from the water, and their interactions in juvenile rainbow trout. Aquatic Toxicology, 72(1–2), 99–117.

- Badisa, V. L., Latinwo, L. M., Odewumi, C. O., Ikediobi, C. O., Badisa, R. B., Ayuk Takem, L. T., ... & West, J. (2007). Mechanism of DNA damage by cadmium and interplay of antioxidant enzymes and agents. Environmental Toxicology: An International Journal, 22(2), 144–151.
- Borgmann, U., Janssen, C. R., Blust, R. J., Brix, K. V., Dwyer, R. L., Erickson, R. J., ... & Wang, W. X. (2005). Incorporation of dietborne metals exposure into regulatory frameworks. Toxicity of dietborne metals to aquatic organisms. Edited by JS Meyer, WJ Adams, KV Brix, SN Luoma, DR Mount, WA Stubblefield, and CM Wood. SETAC Press, Pensacola, Florida, USA, 153–189.
- Brodie, D.A., Jackson, M.J., 2003. Effect of vitamin C supplements on antioxidant defense and stress proteins in human lymphocytes and skeletal muscle. J. Physiol. 549, 645 - 652.
- Bebianno MJ, Company R, Serafim A, Cosson RP, Fiala Medoni A. Antioxidant systems and lipid peroxidation in Bathymodiolus azoricus from mid Atlantic ridge hydrothermal vent fields. Aquat Toxicol 2005;75:354 - 373.
- Bruno, R.S., Leonard, S.W., Atkinson, J., Montine, T.J.,Ramakrishnan, R.,
  Bray, T.M., & Traber, M.G.(2006). Faster plasma vitamin E
  disappearance insmokers is normalized by vitamin C
  supplementation.Free Radical Biology & Medicine, 40(4), 689–697.

- Barton BA (2002) Stress in fishes: a diversity of responses with particular reference to changes in circulating corticosteroids. Integr Comp Biol 42:517 525. doi:10.1093/icb/42.3.517
- Bae, J.Y., Park, G.H., Yoo, K.Y., Lee, J.Y., Kim, D.J., Bai, S.C., 2012. Re-evaluation of the optimum dietary vitamin C requirement in juvenile eel, Anguilla japonica by using L-ascorbyl-2-monophosphate. Asian-Australas. J. Anim. Sci. 25, 98 - 103.
- Borane, V. R. (2013). Protective role of ascorbic acid on the cadmium induced changes in hematology of the freshwater fish, Channa orientalis (Schneider). Adv Appl Sci Res, 4, 305–8.
- Basha, P. S., & Rani, A. U. (2003). Cadmium-induced antioxidant defense mechanism in freshwater teleost Oreochromis mossambicus (Tilapia). Ecotoxicology and environmental safety, 56(2), 218–221.
- Brucka-Jastrzębska, E. (2010). The effect of aquatic cadmium and lead pollution on lipid peroxidation and superoxide dismutase activity in freshwater fish. Polish Journal of Environmental Studies, 19(6), 1139–1150.
- Clark AG. 1989. The comparative enzymology of the glutatione S-tranferases from non-vertebrate organisms. Comp Biochem Physiol 92, 419-446

- Chen, H.Y., Chang, C.F., 1994. Quantification of vitamin C requirements for juvenile shrimp ŽPenaeusmonodon. using polyphosphorylate L-ascorbic acid. J. Nutr. 124, 2033 - 2038
- Cinier, C.C., Petit-Ramel, M., Faure, R., Garin, D., Bouvet, Y., 1999. Kinetics of cadmium accumulation and elimination in carp Cyprinus carpio tissues. Comparative Biochemistry and Physiology 122C, 345 -352.
- Ctenopharyngodon idellus. In Aquatic Toxicology: Mechanism and Consequences. Eds. Chris Kennedy, Alan Kolok and Don MacKinlay. Int. Congress of Fish Biology, Canada (pp. 109–118).
- CiCiK, B., & ENGiN, K. (2005). The effects of cadmium on levels of glucose in serum and glycogen reserves in the liver and muscle tissues of Cyprinus carpio (L., 1758). Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences, 29(1), 113–117.
- Cavalli, R.O., Batista, F.M.M., Lavens, P., Sorgeloos, P., Nelis, H.J., De Leenheer, A.P., 2003. Effect of dietary supplementation of vitamins C and E on maternal performance and larval quality of the prawn Macrobrachium rosenbergii. Aquaculture 227, 131 - 146
- Chang, Z. M., & Wu, S. M. (2003). Effects of cadmium on erythrocyte and lymphocyte of tilapia (Oreochromis mossambicus). Bioformosa, 38,

71 - 78.

- Cope, W. G., J. Wiener, M. T. Steingraeber & G. J. Atchison. 1994. Cadmium, metal-binding proteins, and growth in bluegill (Lepomis macrochirus) exposed to contaminated sediments from the upper Mississippi River basin. Canadian Journal of Fish and Aquatic Science, 51: 1356–1367
- Collvin, L. (1985) The effect of copper on growth, food consumption and food conversion of perch PercaJIuviatilis L. offered maximal food rations. Aquatic Toxicology 6, 105113.
- Carvalho, C. S., & Fernandes, M. N. (2006). Effect of temperature on copper toxicity and hematological responses in the neotropical fish Prochilodus scrofa at low and high pH. Aquaculture, 251(1), 109–117.
- Chen, H., Tappel, A.L., 1995. Protection by vitamin E, selenium, trolox C, ascorbic acid palmitate, acetylcysteine, coenzyme Q0, coenzyme Q10, beta-carotene, canthaxantine, and (b)-catechin against oxidative damage to rat blood and tissues in vivo. Free Radic. Biol. Med. 18, 949 953.
- Cho, C.Y., Cowey, C.B., 1993. Utilization of monophosphate esters of ascorbic acid by rainbow trout (Oncoorhynchus mykiss). In: Kaushik, S.J., Luquet, P. (Eds.), Fish Nutrition in Practice. 4. Int. Symp. Fish

Nutrition and Feeding, 24 - 27 June 1991, Biarritz, France. I.N.R.A., Paris, France, pp. 149 - 156.

- Dabas, A., Nagpure, N. S., Kumar, R., Kushwaha, B., Kumar, P., & Lakra, W. S. (2012). Assessment of tissue-specific effect of cadmium on antioxidant defense system and lipid peroxidation in freshwater murrel, Channa punctatus. Fish physiology and biochemistry, 38(2), 469-482.
- Datta, S., Saha, D.R., Ghosh, D., Majumdar, T., Bhattacharya, S., Mazumder, S., 2007. Sub-lethal concentration of arsenic interferes with the proliferation of hepatocytes and induces in vivo apoptosis in Clariasbatrachus L. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology 145, 339–349.
- de Conto Cinier, C., Petit-Ramel, M., Faure, R., Garin, D., & Bouvet, Y. (1999). Kinetics of cadmium accumulation and elimination in carp Cyprinus carpio tissues. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology, 122(3), 345–352.
- Dethloff, G. M., Bailey, H. C., & Maier, K. J. (2001). Effects of dissolved copper on select hematological, biochemical, and immunological parameters of wild rainbow trout (Oncorhynchus mykiss). Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 40, 371 - 380.

- Dabrowski, K., 2001. History, present and future of vitamin C research in aquatic organism. In: Dabrowski, K. (Ed.), Vitamin C in Aquatic Organisms-Status and Perspectives. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA, pp. 255 - 277.
- Dabrowski, K., 1992. Ascorbate concentration in fish ontogeny. J. Fish. Biol. 40:273–279.
- Dorta, D.J., Leite, S., DeMarco, K.C., Prado, I.M., Rodrigues, T., Mingatto, F.E., Uyemura, S.A., Santos, A.C., Curti, C., 2003. A proposed sequence of events for cadmium-induced mitochondrial impairment. J. Inorg. Biochem. 97, 251 - 257
- Deng, H., He, C.B., Zhou, Z.C., Liu, C., Tan, K.F., Wang, N.B., Jiang, B., Gao, X.G., Liu, W. D., 2009. Isolation and pathogenicity of pathogens from skin ulceration disease and viscera ejection syndrome of the sea cucumber Apostichopus japonicus. Aquaculture 287, 18 - 27.
- Droge, W., 2002. Free radicals in the physiological control of cell function. Physiol. Rev. 82, 47 95.
- Di Giulio RT, Meyer JN (2008) Reactive oxygen species and oxidative stress. In: Di Giulio RT, Hinton DE (eds) The toxicology of fishes. CRC Press, Taylor & Francis Group, New York, USA, pp 274 324

- Dabrowski, K., Matusiewicz, K., Matusiewicz, M., Hoppe, P.P., Ebeling, J., 1996. Bioavailability of vitaimin C from two ascorbyl monophosphate esters in rainbow trout, Oncorhynchus mykiss (Walbaum). Aquacult. Nutr. 2, 3 - 10.
- Dethlo G.M., Bailey H.C. & Maier K.J. (2001) E ects of dissolved copper on select hematological, biochemical, and immunological parameters of wild rainbow trout (Oncorhynchus mykiss). Archives of Environmental Contamination and Toxicology 40, 371–380
- Dang, F., & Wang, W. X. (2009). Assessment of tissue-specific accumulation and effects of cadmium in a marine fish fed contaminated commercially produced diet. Aquatic Toxicology, 95(3), 248–255.
- Dang, F., & Wang, W. X. (2009). Assessment of tissue-specific accumulation and effects of cadmium in a marine fish fed contaminated commercially produced diet. Aquatic Toxicology, 95(3), 248-255.
- De Boeck, G., Vlaeminck, A., Blust, R., 1997. Effects of sublethal copper exposure on copper accumulation, food consumption, growth, energy stores, and nucleic acid content in common carp. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 33, 415 - 422.

- El-Greisy, Z.A., El-Gamal, A.H.A., 2015. Experimental studies on the effect of cadmium chloride, zinc acetate, their mixture and the mitigation with vitamin C supplementation on hatchability, size and quality of newly hatched larvae of common carp, Cyprinus carpio. Egypt. J. Aquat. Res. 41, 219 226.
- El Naggar, G.O., Lovell, R.T., 1991a. L-Ascorbyl-2-monophosphate has equal antiscorbutic activity as L-ascorbic acid but L-ascorbyl-2-sulfate is inferior to L-ascorbic acid for channel catfish. J. Nutr. 121, 1622 - 1626.
- El-Demerdash, F. M., Yousef, M. I., Kedwany, F. S., & Baghdadi, H. H. (2004). Cadmium-induced changes in lipid peroxidation, blood hematology, biochemical parameters and semen quality of male rats: protective role of vitamin E and β-carotene. Food and chemical toxicology, 42(10), 1563–1571.
- Farag AM, Boese CJ, Woodward DF, Bergman H. 1994. Physiological changes and tissue metal accumulation in rainbow trout exposed to foodborne and waterborne metals. Environ Toxicol Chem 13:2021 2029
- Fang, Y., Yang, H.S., Wang, T.M., Liu, B.Z., Zhao, H.L., Chen, M.Y., 2010. Metallothionein and superoxide dismutase responses to sublethal cadmium exposure in the clam Mactra veneriformis. Comp. Biochem.

Phys. C 151, 325 - 333.

- Fox, M. S., Jacobs, R. M., Jones, A. L., Fry, B. E., & Stone, C. L. (1980). Effects of vitamin C and iron on cadmium metabolism. Annals of the New York Academy of Sciences, 355(1), 249–261.
- Farag, A.M., Woodward, D.F., Brumbaugh, W., Goldstein, J.N., MacConnell, E., Hogstrand, C., Barrows, F.T., 1999. Dietary effects of metals-contaminated invertebrates from the Coeur d'Alene River, Idaho, on cutthroat trout. Trans. Am. Fish. Soc. 128, 578 - 592.
- Gomez-Mendikute, A., & Cajaraville, M. P. (2003). Comparative effects of cadmium, copper, paraquat and benzo [a] pyrene on the actin cytoskeleton and production of reactive oxygen species (ROS) in mussel haemocytes. Toxicology in vitro, 17(5-6), 539-546.
- Galan, A., Garcia-Bermejo, L., Troyano, A., Vilaboa, E., Fernandez, C., Blas, E., Aller, P., 2001. The role of intracellular oxidation in death induction (apoptosis and necrosis) in human promonocytic cells treated with stress inducers (cadmium, heat, X-rays). Eur. J. Cell Biol. 80, 312 - 320.
- GILL TS, EPPLE A: Stress-related changes in the hematological profile of the American eel (Anguilla rostrata). Ecotoxicol Environ Saf 25:

227-235, 1993.

- Grosicki, A., 2004. Influence of vitaminC on cadmium absorption and distribution in rats. J. TraceElem. Med.Biol. 18, 183 187.
- Harrison SE, Curtis PJ. 1992. Comparative accumulation efficiency of 109cadmium from natural food (Hyalella azteca) and artificial diet by rainbow trout (Oncorhynchus mykiss). Bull Environ Contam Toxicol 49:757 764.
- Heath, A.G., 1995. Water Pollution and Fish Physiology. CRC press, Boca Raton, pp. 141 - 170.
- Hudecova, A., & Ginter, E. (1992). The influence of ascorbic acid on lipid peroxidation in guinea pigs intoxicated with cadmium. Food and chemical toxicology, 30(12), 1011–1013.

- Hansen BH, Rømma S, Garmo ØA, Pedersen SA, Olsvik PA, Andersen RA. Induction and activity of oxidative stress related proteins during waterborne Cd/Zn exposure in brown trout (Salmo trutta). Chemosphere 2007;67:2241 2249.
- Hilton, J.W., Cho, C.Y., Slinger, S.T., 1977. Factors affecting the stability of supplemental ascorbic acid in practical trout diets. J. Fish Res. Board Can. 34, 683 - 687.
- Hunter, B., Magarelli, P.C., Lightner, D.V., Colvin, L.B., 1979. Ascorbic acid-dependent collagen formation in penaeid shrimp. Comp. Biochem. Physiol. 64B, 381 - 385.
- Henrique, M.M.F., Gomes, E.F., Gouillou –coustans, M.F., Olivateles, A., Davies, S.J.,1998. Influence of supplementation of practical diets with vitamin C on growthand response to hypoxic stress of seabream, Sparus aurata. Aquaculture161:415–426.
- Heath AG (1995) Water pollution and fish physiology. CRCPress, Boca Raton
- Hounkpatin, A. S. Y., Johnson, R. C., Guédénon, P., Domingo, E., Alimba, C. G., Boko, M., & Edorh, P. A. (2012). Protective effects of vitamin C on haematological parameters in intoxicated wistar rats with cadmium, mercury and combined cadmium and mercury. Int Res J Biol Sci, 1(8), 76–81.
- Hilmy, A.M., Shabana, M.B., Daabbes, A.Y.: Effects of cadmium toxicity upon the in vivo and in vitro activity of proteins and five enzymes in blood serum and tissue homogenates of Mugil cephalus. Comp. Biochem. Physiol., 1987; 81C: 145–153.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C., 2007. Free Radicals in Biology and Medicine, 4rd edition. Oxford University Press, New York.

- Hansen, B.H., Rømma, S., Garmo, Ø.A., Pedersen, S.A., Olsvik, P.A., Andersen, R.A., 2007. Induction and activity of oxidative stress-related proteins during waterborne Cd/Zn-exposure in brown trout (Salmo trutta). Chemosphere 67, 2241 - 2249
- Hayes, J.D., Pulford, D.J., 1995. The glutathione S-transferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemprotection and drug resistance. CRC Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol. 30, 445 600.
- Halliwell B, Wasil M, Grootveld M. Biologically significant scavenging of the myeloperoxidase-derived oxidant hypochlorous acid by ascorbic acid. Implications for antioxidant protection in the inflamed rheumatoid joint. FEBS Lett 1987;213(1): 15 - 7.
- Haux C. & Larsson A. (1984) Long-term sublethal physiological effects in rainbow trout, Salmo gairdneri, during exposure to cadmium and after subsequent recovery. AquaticToxicology 5,129–142.
- Harrison SE, Klaverkamp JF. 1989. Uptake, elimination and tissue distribution of dietary and aqueous cadmium by rainbow trout (Salmo gairdneri Richardson) and lake whitefish (Coregonus clupeaformis Mitchill). Environ Toxicol Chem 8:87 - 97.
- Handy, R.D., 1996. Dietary exposure to toxic metals in fish. In: Taylor,

E.W. (Ed.), Toxicology of Aquatic Pollution: Physiology, Cellular and Molecular Approaches. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 29 -60.

- Handy RD. 1996. Toxic metals in the diet. In Taylor EW, ed, Toxicology and Aquatic Pollution, Physiological, Cellular and Molecular Approaches. Society for Experimental Biology Seminar Series. Cambridge University Press, UK, pp 29 - 60.
- Handy RD. 1992. The assessment of episodic metal pollution. II. The effects of cadmium and copper enriched diets on tissue contaminant analysis in rainbow trout (Oncorhynchus mykiss). Arch Environ Contam Toxicol 22:82 87.
- Ishibashi, Y., Kato, K., Ikeda, S., Murata, O., Nasu, T., Kumai, H., 1992. Effect of dietary ascorbic acid on tolerance to intermittent hypoxic stress in Japanese parrot fish. Nippon Suisan Gakkaishi 58, 2147 -2152.
- Jemec A, Tisler T, Drobne D, Sepcic K, Jamnik P, Ros M. Biochemical biomarkers in chronically metal stressed daphnids. Comp Biochem Physiol C 2008;147:61 - 68.
- Joshi, P. K., & Bose, M. (2002, July). Toxicity of Cadmium: A comparative study in the air breathing fish, Clarias batrachus and in

non-air breathing one, Ctenopharyngodon idellus. In Aquatic Toxicology: Mechanism and Consequences. Eds. Chris Kennedy, Alan Kolok and Don MacKinlay. Int. Congress of Fish Biology, Canada (pp. 109-118).

- Ján, M., & František, N. (2000). Cadmium-induced changes in cation-osmotic haemolysis in rats. Environmental toxicology and pharmacology, 8(2), 79-81.
- Jiraungkoorskul, W., Sahaphong, S., 2007. Efficacy of ascorbic acid reducing waterborne copper toxicity in butterfish (Poronotus traicanthus). J. Biol. Sci. 7, 620 - 625.
- Kehrer, J.P., 1993. Free radicals as mediators of tissue injury and disease. Critical Reviews in Toxicology 23, 21 48.
- Kumada H, Kimura S, Yokote M. 1980. Accumulation and biological effects of cadmium in rainbow trout. Bull Jpn Soc Sci Fish 46:97 103.
- Kim, J. H., & Kang, J. C. (2017). Toxic effects on bioaccumulation and hematological parameters of juvenile rockfish Sebastes schlegeliiexposed to dietary lead (Pb) and ascorbic acid. Chemosphere, 176,131–140.

- Kim JH, Kang JC (2015) Oxidative stress, neurotoxicity, and nonspecific immune responses in juvenile red sea bream, Pagrus major, exposed to different waterborne selenium concentrations. Chemosphere 135:46 -52
- Kim, J. H., Kang, J.C., 2014. The selenium accumulation and its effect on growth, and haematological parameters in red sea bream, Pagrusmajor, exposed to waterborne selenium. Ecotoxicology and Environmental Safety 104, 96–102.
- Kuroshima, R. (1987) Cadmium accumulation and its effect on calcium metabolism in the girella Girella punctata suring a long term exposure. Bulletin of the Japanese Society Scientific Fisheries 53, 445 450.
- Kim, S. G., Eom, K. H., Kim, S. S., Jin, H. G., & Kang, J. C. (2006). Kinetics of Cd accumulation and elimination in tissues of juvenile rockfish (Sebastes schlegeli) exposed to dietary Cd. Marine environmental research, 62(5), 327–340.
- Klaaassen CD, Liu J, Choudhuri S. Metallothionein: an intracellular protein to protect against cadmium toxicity. Annu Rev Pharmacol Toxicol 1999;39:267–294

Kumar, P., Prasad, Y., Patra, A. K., Ranjan, R., Swarup, D., Patra, R.

C., & Pal, S. (2009). Ascorbic acid, garlic extract and taurine alleviate cadmium-induced oxidative stress in freshwater catfish (Clarias batrachus). Science of the total environment, 407(18), 5024–5030.

- Khassaf, M., McArdle, A., Esanu, C., Vasilaki, A., McArdle, F., Griffiths, R.D., Shahkar, E., Yun, H., Kim, D. J., Kim, S. K., Lee, B. I., & Bai, S. C. (2015). Effects of dietary vitamin C levels on tissue ascorbic acid concentration, hematology, non-specific immune response and gonad histology in broodstock Japanese eel, Anguilla japonica. Aquaculture, 438, 115–121.
- Kim YS, Do YH, Min BH, Lim HK, Lee BK and Chang YJ.2009. Physiological responses of starry flounder Platichthys stellatus during freshwater acclimation with differentspeeds in salinity change. J Aquaclt 22, 28–33.
- Karuppasamy R, Subathra S, Puvaneswari S (2005) Haematological responses to exposure to sublethal concentratio of cadmium in air breathing fish, Channa punctatus (Bloch). J Environ Biol 26:123 - 128
- Khadre SEM (1988) The effect of experimentally induced inflammation on the blood pattern and haemopoietic organs of the teleost, Clarias lazera. Bull Inst Oceano Fish ARE 14:191 - 203

Kim, J. H., Rhee, J. S., Lee, J. S., Dahms, H. U., Lee, J., Han, K. N., &

Lee, J. S. (2010). Effect of cadmium exposure on expression of antioxidant gene transcripts in the river pufferfish, Takifugu obscurus (Tetraodontiformes). Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology, 152(4), 473–479.

- Kamunde C, Clayton C, Wood CM (2002): Waterborne vs. dietary copper uptake in rainbow trout and the effects of previous waterborne copper exposure. American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology 283, R69 - R78.
- Kim, J. H., Dahms, H. U., Rhee, J. S., Lee, Y. M., Lee, J., Han, K. N., & Lee, J. S. (2010). Expression profiles of seven glutathione S-transferase (GST) genes in cadmium-exposed river pufferfish (Takifugu obscurus). Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology, 151(1), 99–106.
- Kanazawa, A., Teshima, S., Koshio, S., Higashi, M., Itoh, S., 1992. Effect of L-ascorbyl-2-phosphate - Mg on the yellowtail Seriola quinqueradiata as a vitamin C source. Nippon Suisan Gakkaishi 58, 33 - 341.
- Kumada H, Kimura S, Yokote M. 1980. Accumulation and biological effects of cadmium in rainbow trout. Bull Jpn Soc Sci Fish 46:97 103.

- Livingstone DR (2003): Oxidative stress in aquatic organism in relation to pollution and agriculture. Revue de Medecine Veterinaire 154, 427 -430.
- Lewin, S., in: Vitamin C: its Molecular Biology and Medical Potential. Academic Press, London, New York, San Francisco 1976.
- Lozano G, Herraiz E, Hardisson A, Gutiérrez AJ, González-Weller D, Rubio C. Heavy andtrace metal concentrations in three rockpool shrimp species (Palaemon elegans,Palaemon adspersus and Palaemon serratus) from Tenerife (Canary Islands). Environ Monit Assess 2010;168(1 - 4):451 - 60.
- Lin, M.F., Shiau, S.Y., 2005. Dietary L-ascorbic acid affects growth, nonspecific immune responses and disease resistance in juvenile grouper, Epinephelus malabaricus. Aquaculture 244, 215 - 221.
- Lacroix, A., Hontela, A., 2004. A comparative assessment of the adrenotoxic effects of cadmium in two teleost species, rainbow trout, Oncorhynchus mykiss, and yellow perch, Perca flavescens. Aquat. Toxicol. 67, 13 21.
- Lemaire, G. S. & P. Lemaire. 1992. Interactive effect of cadmium and benzopyrene on cellular structure and biotransformation enzymes of the liver of the European eel. Aquatic Toxicology, 22: 145–160

- Lovell, R.T., Lim, C., 1978. Vitamin C in pond diets for channel catfish. Trans. Am. Fish. Soc. 107, 321 - 325.
- Larsoon A, Bengstsson BE, Svanberg O (1976) Some haematological and biochemical effects of cadmium on fish. In: Lockwood APM(ed) Effects of pollutants in aquatic organisms. Cambridge University Press, Cambridge, UK, pp 35 - 45
- Levesque, H. M., Moon, T. W., Campbell, P. G. C., & Hontela, A. (2002). Seasonal variation in carbohydrate and lipid metabolism of yellow perch (Perca flavescens) chronically exposed to metals in the field. Aquatic Toxicology, 60(3–4), 257–267.
- Merchie, G., Lavens, P., Radull, J., Nelis, H., De Leenheer, A., Sorgeloos, P., 1995. Evaluation of vitamin C enriched Artemia nauplii for larvae of the giant freshwater prawn. Aquac. Int. 3, 355 - 363.
- Mai, K., Li, H., Ai, Q., Duan, Q., Xu, W., Zhang, C., ... & Liufu, Z. (2006). Effects of dietary squid viscera meal on growth and cadmium accumulation in tissues of Japanese seabass, Lateolabrax japonicus (Cuvier 1828). Aquaculture Research, 37(11), 1063–1069.
- Mirghaed, A. T., Ghelichpour, M., Hoseini, S. M., & Amini, K. (2017). Hemolysis interference in measuring fish plasma biochemical indicators. Fish physiology and biochemistry, 43(4), 1143–1151.

- Martínez-Álvarez, R. M., Morales, A. E., & Sanz, A. (2005). Antioxidant defenses in fish: biotic and abiotic factors. Reviews in Fish Biology and fisheries, 15(1–2), 75–88.
- Messaoudi, I., Barhoumi, S., Saïd, K., & Kerken, A. (2009). Study on the sensitivity to cadmium of marine fish Salaria basilisca (Pisces: Blennidae). Journal of Environmental Sciences, 21(11), 1620–1624.
- McGeer, J. C., Szebedinsky, C., McDonald, D. G. and Wood, C. M. (2000). Effects of chronic sublethal exposure to waterborne Cu, Cd or Zn in rainbow trout 2: tissue specific metal accumulation. Aquat. Toxicol. 50, 245–256.
- Moreira SM, Moreira-Santos M, Ribeira R and Giulhermino L. 2004. The "Coral Bullker" fuel oil spill on the north coast of Portugal: spatial and temporal biomarker responses in Mytilus galloprovincialis. Ecotoxicology 13, 619–630.
- Mekkawy, I. A., Mahmoud, U. M., Wassif, E. T., & Naguib, M. (2011). Effects of cadmium on some haematological and biochemical characteristics of Oreochromis niloticus (Linnaeus, 1758) dietary supplemented with tomato paste and vitamin E. Fish physiology and biochemistry, 37(1), 71–84.

Maheswaran, R., Devapanl, A., Muralidharan, S., Velmurugan, B.,

Ignaeimuthu, S., 2008. Haematological studies of fresh water fish, Clariasbatradrus (L) exposed to mercuric chloride.

- McGeer, J.C., Niyogi, S., Smith, D.S., 2012. Cadmium. In: Wood, C.M., Farrell, A.P. Brauner, C.J. (Eds.), Homeostasis and Toxicology of Non-Essential Metals. Elsevier London, UK, pp. 125 - 184.
- Mohamed, S., Kheireddine, O., Wyllia, H. M., Roquia, R., Aicha, D., & Mourad, B. (2008). Proportioning of biomarkers (GSH, GST, AChE, Catalase) indicator of pollution at Gambusia affinis (Teleostei Fish) exposed to cadmium. Environ. Res. J, 2(4), 177-181.
- Miyasaki, T., Sato, M., Yoshinaka, R., Sakaguchi, M., 1992. Conversion of ascorby1-2-polyphosphate to ascorbic acid in rainbow trout. Nippon Suisan Gakkaishi 58, 2101 - 2104.
- Miliou, H., Zaboukas, N., & Moraitou-Apostolopoulou, M. (1998). Biochemical composition, growth, and survival of the guppy, Poecilia reticulata, during chronic sublethal exposure to cadmium. Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 35(1), 58–63.
- Novelli, E. L. B., E. P. Vieira, N. L. Rodrigues & B. O. Ribas. 1998. Risk assessment of cadmium toxicity on hepatic and renal tissues of rats. Environmental Research, 79: 102–105.

- Nemcsok, J., & Boross, L. (1982). Comparative studies on the sensitivity of different fish species to metal pollution. Acta Biologica Academiae Scientiarum Hungaricae, 33(1), 23–27.
- Nishiyama, Y., H. Ikeda, N. Haramaki, N. Yoshida & T. Imaizume. 1998. Oxidative stress is related to exercise intolerance in patients with heart failure. American Heart Journal, 135:115–120.
- Nelson, D.L., Cox, M.M., 2000. Lehninger Principles of Biochemistry. Worth Publishers, New York. pp. 623 - 658.
- Nemmiche, S., Chabane-S, D., Guiraud, P., 2007. Role of α-tocopherol in cadmiuminduced oxidative stress in Wistar rat's blood, liver and brain. Chem. Biol. Interact. 170, 221 230.
- Olsson P, Kling P, Hogstrand C. 1998. Mechanisms of heavy metal accumulation and toxicity in fish. In Langston WJ, Bebianno MJ, eds, Metal Metabolism in the Aquatic Environment. Chapman & Hall, London, UK, pp 321 - 350.
- Onosaka, S., Kawakami, D., Min, K. S., Oo-Ishi, K., & Tanaka, K. (1987). Induced synthesis of metallothionein by ascorbic acid in mouse liver. Toxicology, 43(3), 251–259.
- Olmedo, P., Pla, A., Hernández, A. F., Barbier, F., Ayouni, L., & Gil, F.

(2013). Determination of toxic elements (mercury, cadmium, lead, tin and arsenic) in fish and shellfish samples. Risk assessment for the consumers. *Environment international*, *59*, 63–72.

- Öner, M., Atli, G., & Canli, M. (2008). Changes in serum biochemical parameters of freshwater fish Oreochromis niloticus following prolonged metal (Ag, Cd, Cr, Cu, Zn) exposures. Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal, 27(2), 360–366.
- Ognjanović B.I., Pavlović S.Z., Maletić S.D., Zikić R.V., Stajn A.S., Radojicić R.M., Saicić Z.S. and Petrović V.M., Protective Influence of Vitamin E on Antioxidant Defense System in the Blood of Rats Treated with Cadmium, Physiol. Res., 52 (5), 563–570 (2003)
- Pratap, H.B., Fu, H., Lock, R.A.C., Wendelaar Bonga, S.E., 1989. Effect of waterborne and dietary cadmium on plasma ions of the teleost Oreochromis mossambicus in relation to water calcium levels. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 18, 568 - 575.
- Pratap, H.B., Wendelaar Bonga, S.E., 1993. Effect of ambient and dietary cadmium on pavement cells, chloride cells, and Na+/K+ -ATPase of the freshwater teleost Oreochromis mossambicus at normal and high calcium levels in the ambient water. Aquat. Toxicol. 26, 133 150.

Potter DW, Tran TB. Apparent rates of glutathione turnover in rat

tissues. Toxicol Appl Pharmacol 1993;120:186 - 192.

- Pascual, P., Pedrajas, J. R., Toribio, F., López-Barea, J., & Peinado, J. (2003). Effect of food deprivation on oxidative stress biomarkers in fish (Sparus aurata). Chemico-biological interactions, 145(2), 191–199.
- Reynders, H., Bervoets, L., Gelders, M., De Coen, W.M., Blust, R. (2008). Accumulation and effects of metals in caged carp and resident roach along a metal pollution gradient. Sci. Total Environ. 391: 82 95.
- Ren, T., Koshio, S., Ishikawa, M., Yokoyama, S., Micheal, F.R., Uyan, O., Tung, H.T., 2007. Influence of dietary vitamin C and bovine lactoferrin on blood chemistry and nonspecific immune responses of Japanese eel, Anguilla japonica. Aquaculture 267, 31 - 37.
- Romani, R., Antognelli, C., Baldracchini, F., Santis, A., Isani, G., Giovannini, E., Rosi, G., 2003. Increased acetylcholinesteras activities in specimens of Sparus auratus exposed to subletha concentrations. Chem. Biol. Interact. 145, 321 - 329.
- Romeo M, Bennani M, Gnassia-Barelli M, Lafaurie M, Girard J ´ P, 2000. Cadmium and copper display different responses towards oxidative stress in the kidney of the sea bass Dicentrarchus labrax. Aquatic Toxicology, 48: 185 - 194.

- Szebedinszky, C., McGeer, J. C., McDonald, D. G., & Wood, C. M. (2001). Effects of chronic Cd exposure via the diet or water on internal organ specific distribution and subsequent gill Cd uptake kinetics in juvenile rainbow trout (Oncorhynchus mykiss). Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal, 20(3), 597–607.
- Smet H.D. & Blust R. (2001) Stress response and changes in protein metabolism in carp Cyprinus carpio during cadmium exposure. Ecotoxicology and Environmental Safety 48, 255–262.
- Sayeed, I, Parvez, S, Pandey, S, Bin Hafeez, B, Haque, R, Raisuddin,
  S. Oxidative stress biomarkers of exposure to deltamethrin in freshwater fish, Channa punctatus (Bloch). Ecotox Environ Saf 2003; 56: 295 301.
- Shao, B., Zhu, L.S., Dong, M., Wang, J., Wang, J.H., Xie, H., Zhang, Q.M., Du, Z.K., Zhu, S.Y., 2012. DNA damage and oxidative stress induced by endosulfan exposure in zebrafish (Danio rerio). Ecotoxicology 21, 1533 - 1540.
- Shiau, S.Y., Hsu, T.S., 1995. L-Ascorbyl-2-sulfate has equal antiscorbutic activity as Lascorbyl-2-monophosphate for tilapia,Oreochromis niloticus x O. aureus.Aquaculture 133:147-157.

- Schoenmakers TJM, Klaren PHM, Flik G, Lock RAC, Pang PKT, Wendelaar Bonga SE. 1992. Actions of cadmium on basolateral plasma membrane proteins involved in calcium uptake by fish intestine. J Membr Biol 127:161 - 172.
- Shiau, S. Y., &Hsu, T. S. (1995). Tissue storage of ascorbic acid in tilapia Oreochromis niloticus × O. aureus fed L-ascorbic acid, L-ascorbyl-2-sulfate or L-ascorbyl-2-monophosphate. *Fisheries science*, 61(6), 1043-1044.
- Shiau, S.Y., Hsu, T.S., 1994. Vitamin C requirement of grass shrimp, Penaeus monodon, as determined withL-ascorbyl-2-monophosphate. Aquaculture 122, 347 - 357.
- Schlenk D, Rice CD (1998) Effects of zinc and cadmium treatment on hydrogen peroxide-induced mortality and expression of glutathione and metallothionein in a teleost hepatoma cell line. Aquat Toxicol 43:121 - 129
- Sayeed, I., Parvez, S., Pandey, S., Bin-Hafeez, B., Haque, R., & Raisuddin, S. (2003). Oxidative stress biomarkers of exposure to deltamethrin in freshwater fish, Channa punctatus Bloch. Ecotoxicology and environmental safety, 56(2), 295–301.

Shaban El-Neweshy M, Said El-Sayed Y (2011) Influence of vitamin C

supplementation on lead-induced histopathological alterations in male rats. Exp Toxicol Pathol 63:221 - 7. doi:10.1016/j.etp.2009. 12.003

- Sevcikova, M., Modra, H., Slaninova, A., & Svobodova, Z. (2011). Metals as a cause of oxidative stress in fish: a review. Vet Med, 56(11), 537-546.
- Soliman, A.K., Jauncey, K., Roberts, R.J., 1986. The effect of varying forms of dietary ascorbic acid on the nutrition of juvenile tilapias (Oreochromis niloticus). Aquaculture 52, 1 10.
- Shiau, S.Y., Hsu, T.S., 1995. L-Ascorbyl-2-sulfate has equal antiscorbutic activity as L-ascorbyl-2-monophosphate for tilapia, Oreoochromis niloticus O. aureus. Aquaculture 133, 147 157.
- Shiau, S. Y., & Jan, F. L. (1992). Dietary ascorbic acid requirement of juvenile tilapia Oreochromis niloticus x O. aureus. Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries (Japan).
- Soengas, J.L., Agra Lago, M.J., Carballo, B., Andre´s, M.D., Veira, J.A.R. (1996). Effect of an acute exposure to sublethal concentrations of cadmium on liver carbohydrate metabolism of Atlantic salmon (Salmo salar). Bull. Environ. Contam. Toxicol. 57: 625 631.

Sorensen, E.M., 1991. Cadmium. In: Metal Poisoning in Fish. CRC

Press, Boca Raton, pp. 175 - 234.S'wiergosz, R., Zakrzewska, M.,

- Sawicka-Kapusta, K., Bacia, K., Janowska, I., 1998. Accumulation of cadmiumin and its effect on bank vole tissues after chronic exposure. Ecotoxicology and Environmental Safety 41, 130 136.
- Soliman, A.K., Jauncey, K., Roberts, R.T., 1987. Stability of ascorbic acid vitamin C and its forms in fish feeds during processing, storage and leaching. Aquaculture 60, 73 83.
- Shiau, S. Y., & Hsu, T. S. (1999). Quantification of vitamin C requirement for juvenile hybrid tilapia, Oreochromis niloticus× Oreochromis aureus, with L-ascorbyl-2-monophosphate-Na and L-ascorbyl-2-monophosphate-Mg. Aquaculture, 175(3-4), 317-326.
- Shiau, S.Y., Hsu, T.S., 1993. Stability of ascorbic acid in shrimp feed during analysis. Nippon Suisan Gakkaishi 59, 1535 1537.
- Sastry, K.V., Rao, D.R.: Effects of mercuric chloride on some biochemical and physiological parameters of the freshwater murrel Channa punctatus. Environ. Res., 1984; 34: 343–350.
- Tandon, S.K., Singh, S., Prasad, S., Khandekar, K., Dwivedi, V.K., Chatterjee, M.,Mathur, N., 2003. Reversal of cadmium induced oxidative stress by chelating agent, antioxidant or their combination

in rats. Toxicol. Lett. 145, 211 - 217.

- Tolbert, B.M., 1979. Ascorbic acid metabolism and physiological function. Int. J. Vit. Nutr. Res. 19, 127 142, Suppl.
- Thomann RV, Shkreli F, Harrison S. 1997. A pharmacokineticmodel of cadmium in rainbow trout. Environ Toxicol Chem 16: 2268 2274.
- Tao S, Wen Y, Long A, Dawson R, Cao J, Xu F (2001): Simulation of acid-base condition and copper speciation in fish gill microenvironment. Computers and Chemistry 25, 215 222.
- Tolbert, B.M., 1979. Ascorbic acid metabolism and physiological function. Int. J. Vit. Nutr. Res. Suppl., 19:127–142.
- Teshima, S.I., Kanazawa, A., Koshio, S., Itoh, S., 1993. L-Ascorbyl-2-phosphate-Mg as vitamin C source for the Japanese flounder (Paralichthys olivaceus). In: S.J. Kaushik and P. Luquet (eds.) Fish nutrition in practice, INRA Publ., Paris, France, pp 157-166.
- Vinodhini, R., & Narayanan, M. (2008). Bioaccumulation of heavy metals in organs of fresh water fish Cyprinus carpio (Common carp). International Journal of Environmental Science & Technology, 5(2), 179–182.

- Wedemeyer G.A. & YasutakeW.T. (1977) Clinical methods for the assessment of the effects of environmental stress on fish health. United States Technical Papers and United States Fish Wildlife Services 89,1–18.
- Woodward DF, Farag AM, Bergman HL, DeLonay AJ, Little EE, Smith CE, Barrows FT. 1995. Metals-contaminated benthic invertebrates in the Clark Fork River, Montana: Effects on age-0 brown trout and rainbow trout. Can J Fish Aquat Sci 52:1994 2004.
- Wang, J., Ren, T., Wang, F., Han, Y., Liao, M., Jiang, Z., & Liu, H. (2016). Effects of dietary cadmium on growth, antioxidants and bioaccumulation of sea cucumber (Apostichopus japonicus) and influence of dietary vitamin C supplementation. Ecotoxicology and environmental safety, 129, 145–153.
- Wilson, R.P., 1973. Absence of ascorbic acid synthesis in channel catfish Ictalurus punctatus and blue catfish Ictalurus frucatus. Comp. Biochem. Physiol. B 46, 635 - 638.
- Winston, G.W. and Di Giulio, R.T. (1991) Prooxidant and antioxidant mechanisms in aquatic organisms. Aquatic Toxicology, 19: 137-161.
- Wang, X., Kim, K. W., & Bai, S. C. (2003). Comparison of L-ascorbyl-2-monophosphate-Ca with

L-ascorbyl-2-monophosphate-Na/Ca on growth and tissue ascorbic acid concentrations in Korean rockfish (Sebastes schlegeli). Aquaculture, 225(1-4), 387-395.

- Wedemeyer, GA and D.J. McLeay, 1981. Methods for Determining the Tolerance of Fishes to Environmental Stressors. In: Stress and Fish. Edited by Pickering, A.D. Academic press, London, pp: 247–275.
- Wu, J. P., Chen, H. C., & Huang, D. J. (2008). Histopathological and biochemical evidence of hepatopancreatic toxicity caused by cadmium and zinc in the white shrimp, Litopenaeus vannamei. Chemosphere, 73(7), 1019–1026.
- Wilson, R.P. & Poe, W.E. (1973) Impaired collagen formation in the scorbutic channel catfish. Journal of Nutrition 103, 1359 1364.
- Wang, X., Kim, K. W., Bai, S. C., Huh, M. D., & Cho, B. Y. (2003). Effects of the different levels of dietary vitamin C on growth and tissue ascorbic acid changes in parrot fish (Oplegnathus fasciatus). Aquaculture, 215(1–4), 203–211.
- Wang, X., Kim, K. W., & Bai, S. C. (2003). Comparison of L-ascorby1-2-monophosphate-Ca with L-ascorby1-2-monophosphate-Na/Ca on growth and tissue ascorbic acid concentrations in Korean rockfish (Sebastes schlegeli).

Aquaculture, 225(1-4), 387-395.

- Yadav, S. S., Kumar, R., Khare, P., & Tripathi, M. (2015). Oxidative stress biomarkers in the freshwater fish, Heteropneustes fossilis (Bloch) exposed to sodium fluoride: antioxidant defense and role of ascorbic acid. Toxicology international, 22(1), 71.
- Yoshida, Y., Itoh, N., Saito, Y., Hayakawa, M., & Niki, E. (2004). Application of water-soluble radical initiator, 2, 2' -azobis-[2-(2-imidazolin-2-yl) propane] dihydrochloride, to a study of oxidative stress. Free radical research, 38(4), 375-384.
- Yang JL, Chen HC (2003) Effects of gallium on common carp (Cyprinus carpio): acute test, serum biochemistry, and erythrocyte morphology. Chemosphere 53:877 882
- You WC, Zhang L, Gail MH, Chang YS, Liu WD, Ma JL, Li JY, Jin ML, Hu YR, Yang CS, Blaser MJ, Correa P, Blot WJ, Fraumeni JF Jr, Xu GW (2000) Gastric dysplasia and gastric cancer: Helicobacter pylori, serum vitamin C, and other risk factors. J Natl Cancer Inst 92:1607 - 12
- Zheng, J. L., Luo, Z., Chen, Q. L., Liu, X., Liu, C. X., Zhao, Y. H., & Gong, Y. (2011). Effect of waterborne zinc exposure on metal accumulation, enzymatic activities and histology of Synechogobius

hasta. Ecotoxicology and environmental safety, 74(7), 1864-1873.

Žikić RV, Štajn AŠ, Pavlović SZ, Ognjanović BI, Saićić ZS (2001) Activities of superoxide dismutase and catalase in erythrocytes and plasma transaminases of goldfish (Carassius auratus gibelio Bloch.) exposed to cadmium. Physiol Res 50: 105–111.

