



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

이 학 석 사 학 위 논 문

식이성 간비대 유발 넙치
(*Paralichthys olivaceus*)에 대한
혈액성상 및 상처회복에 관한 연구



2020년 2월

부 경 대 학 교 대 학 원

수 산 생 명 의 학 과

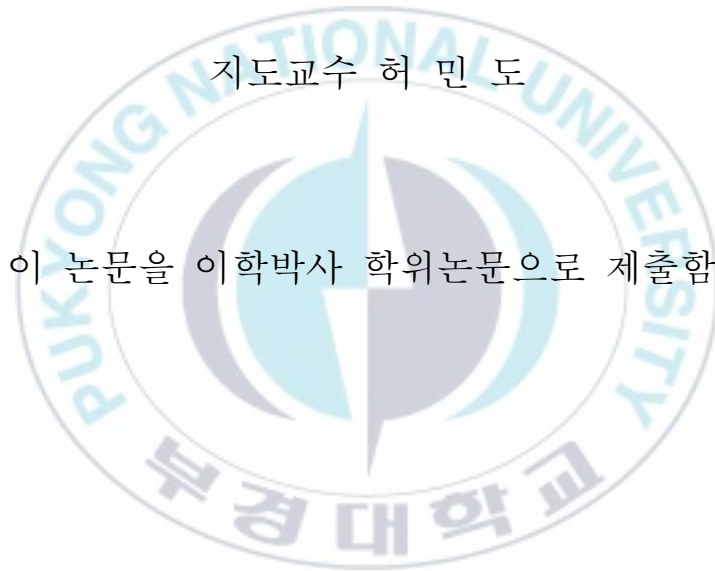
박 지 원

이 학 석 사 학 위 논 문

식이성 간비대 유발 넙치
(*Paralichthys olivaceus*)에 대한 혈액
성상 및 상처회복에 관한 연구

지도교수 허 민 도

이 논문을 이학박사 학위논문으로 제출함.



2020년 2월

부 경 대 학 교 대 학 원

수산생명의학과

박 지 원

박지원의 이학석사 학위논문을 인준함.

2020년 2월 21일

위 원 장 약학박사 정 준 기 (인)

위 원 이학박사 정 현 도 (인)

위 원 농학박사 허 민 도 (인)

목 차

Abstract.....	ii
I. 서론	1
II. 재료 및 방법	5
1. 실험어 관리 및 실험 사료 급여	5
2. Wounding 및 샘플수집	7
3. 혈액학적 분석	8
4. 조직학적 분석	8
5. 이미지 분석	11
6. 통계학적 분석	11
III. 결과	12
1. 생체량 측정	12
2. 간장의 조직병리학적 측정	15
3. 혈액학적 관찰	23
4. 상처회복 관찰	27
IV. 고찰	31
V. 요약	36
VI. 상처회복그림 및 그림 설명	37
감사의 글	
참고문헌	

A study of blood component and the wound healing in olive flounder,
Paralichthys olivaceus induced dietary liver hypertrophy

Ji-Won Park

Department of *Aquatic life medicine*, Graduate School,

Pukyong National University

Abstract

The liver is an organ responsible for the processing, storage, transportation, and detoxification of metabolic intermediates in vivo. Decreased liver function can cause many clinical problems. Liver hypertrophy is likely to cause hypoxic damage in hepatic cells, resulting in mechanical distortion and obstruction of surrounding sinusoidal capillary and Disse space. If structural abnormality in the liver occurs, it will cause functional impairment on the basis of structure function relationship, which will result in a condition that is vulnerable to secondary infections or external stimuli. In fish, identifying and managing the health status of the liver is very important and it is thought that there is a need to study how histological changes in the liver affect the fish. Therefore, in this experiment, we wanted to make sure that the high fat diet could artificially change the histological structure. At the same time, we observed the process of wounds

healing as part of an effort to see if the abnormality of liver induced by the high fat diet was negatively related to the health of the fish.

After feeding 2%/fish body weight of the feed containing 24% lipid in olive flounder for 2 week, three wounds on back with a 2mm biopunch. After the wounds were cut, the samples were sampled on the 1, 7, 14 and 21 days to observed a change in the wound and blood component for 3 weeks.

As a result, A liver hypertrophy appeared in the 2 weeks after fed and was formed in most fish in the 4 weeks. The Total cholesterol was significantly high in the 3, 5weeks in groups(HF, HF-injury). As a result of comparing the recovery of the wounds between liver hypertrophy and normal, there was no significant difference. The thickness of the epithelial cells showed no difference between the two groups(HFI, FI) and the wound recover process in HFI and FI groups was shown in the order of re-epitheliaization, inflammation and remodeling, and the cell components and processes that appeared in each process were the same. There was no difference in wound healing process between 2 groups, and so a state of liver hypertrophy which is a pre-stage of fatty change does not seem significantly to affect the healthiness of fish.

I. 서 론

고등동물에서 간은 생체 내 항상성(homeostasis)을 유지하고 물질대사에서 대사중간체의 처리, 저장, 수송 및 해독 등의 중요한 기능을 담당하는 기관으로 탄수화물 대사, 아미노산 및 단백질 대사, 지방 대사, 담즙산 및 빌리루빈 대사, 비타민 및 무기질 대사, 호르몬 대사, 해독 작용 및 살균 작용 등 다수의 대사작용을 수행하는 것으로 알려져 있다(Kumar, Cotran, and Robbins 2004). 고등동물의 경우와 같이 어류의 간장도 동일한 역할을 수행하며, 특히 외부 물질에 영향을 많이 받는 장기로 어체의 영양상태를 가장 잘 나타내며 영양학적, 생리학적, 면역학적 상태의 장기 지표로 사용된다 (Takashima and Hibiya 1995; Bilton and Robins 1973; Segner and Juario 1986; Sheth and Bankey 2001). 그러므로 간장은 체내 항상성 장기(Sheth 2001)로 불려지고 그 기능은 생체의 면역성 유지와 깊은 연관이 있다고 보아야 한다.

간 기능이 저하되면 여러 임상적 문제가 발생하게 된다. 예로 인의에서 비알코올성지방간(NAFLD)은 당뇨병, 비정상적인 지질 대사, cytokines/adipokines 조절장애와 관련이 깊고(Watanabe et al. 2008), 비알코올성 지방간(NAFLD) 환자의 90% 이상에서 심혈관계 질환, 비만 및 2형 당뇨 등과 같은 대사성 질환을 보이는 것으로 알려져(Marchesini et al. 2003) 간 질환과 대사증후군과의 관계가 점점 중요하게 인식되고 있다. Zebra fish에서 NAFLD 유발 후 당뇨병과의 연관 관계를 연구한 사례(Oka et al. 2010)를 보면 어류에서도 간의 변화가 대사증후군과 관련이 높을 것으로 생각되지만 이에 대한 연구는 아직 미흡한 실정이다.

구조는 기능과 항상 연관이 있다. 임상 질병으로 나타나기 전 인식되는 간장의 구조적 이상은 기질적 내지 전구(조)성 병변으로 판단된다. 이 전구성 병변은 항상성 기능 저하를 암시하는 중요한 형태학적 소견이 된다. 항상성 장기인 간장 구조 이상은 기능 이상으로 연결된다. 항상성은 면역성의 또 다른 용어로, 항상성 기능에 손상을 받게 되면 생체내 기능이 저하되어 2차 감염 또는 외부자극에 취약한 상태(Caraceni et al. 1999)가 된다. 따라서 어류에 있어 간장의 건강상태를 파악하고 관리하는 일은 양식에서 질병 예방을 위해 매우 중요하다. 그러므로 조직학적 변화가 어체의 건강에 어떤 영향을 미치는지 연구할 필요성이 있다고 생각된다.

대부분 양식어류는 과도한 급이로 인해 정상적인 간장 구조를 갖지 못하고 비대한 형태의 간세포를 가지고 있다. 어류 간세포의 식이성 비대는 지방 및 탄수화물의 과다한 급이에 의한 것으로 다수 보고되며 (Fontagne et al. 1998; Caballero et al. 2002; 김경剛, 최혜미, and 박상欄)) 간세포의 용적 증가는 주위 동양혈관 및 Disse 공간의 왜곡 및 폐색을 가져와 간세포의 저산소성 손상을 가져올 가능성이 높다(이, 2008). 실제 고등척추동물에서 간세포의 용적증가는 간실질에서 산소와 다양한 대사물질들을 수송하는 동양혈관과 Disse 공간을 압박하여 간장의 미세혈액순환(microcirculation)에 장애를 초래하여 간세포 손상을 줄 가능성이 많은 것으로 보고되고 있다(Ijaz et al. 2003; McCuskey et al. 2004). 어류의 간장은 portal triad가 분명하지 않으나 동양혈관과 이를 통한 각종 물질의 이동 및 대사는 고등척추 동물과 동일하므로(Polakof et al. 2012) 간세포의 비대에 따른 동양혈관 및 Disse 공간 왜곡으로 산소를 포함한 각종 영양물질의 흡수, 분비에 장애를 초래할 수 있다. 또한 지방 급이로 인한 간 비대는 지방간으로 가는 한 과정이라는 의의를 가지고 있다.

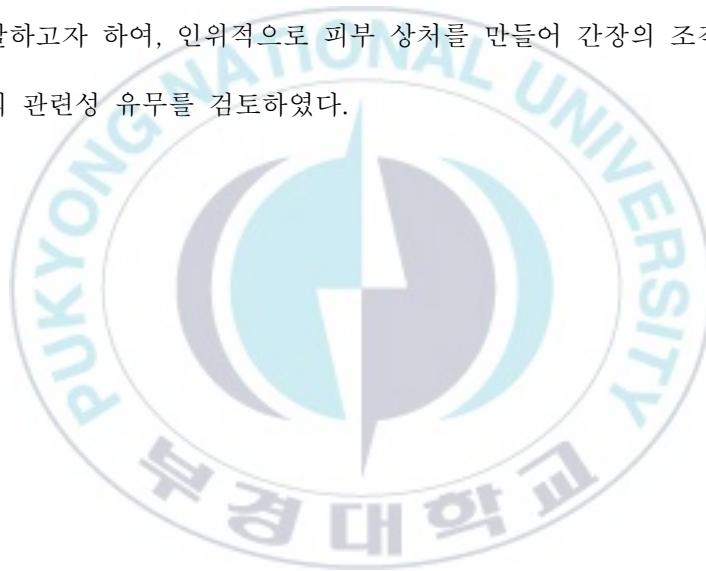
고지방 급이는 비만, 고지혈증, 만성신장질환, 간 비대, 지방간을 일으키는 원인으로, 간 상태를 변화 시킬 수 있는 가장 쉬운 식이방법이다. 대부분의 포유류 동물 실험에서는 NAFLD를 일으키기 위해 고지방급이를 사용하며 (Tipoe et al. 2009; Nakamura and Terauchi 2013; Chao et al. 2014)), 어류에 있어서도 고지방급이를 통해 제브라피쉬에 간종양이 발생하였고(Oka et al. 2010), 실제로 고농도 어유에 의한 간비대 현상은 일련의 다른 실험에서도 확인되었다(김경剛, 최혜미, and 박상欄).

피부 질병과 상처는 대부분의 양식 어류에서 흔하게 나타나며(Fontenot and Neiffer 2004), 집약적으로 양식되는 어류는 수송, 선별, 백신, 감염과 같은 다양한 스트레스 인자에 노출되어 외피의 상처가 발생 하게 된다(Jensen et al. 2015). 수생생물인 어류에서 외피는 환경과 접하는 첫 번째 장벽으로 정상적인 내부 생리적 기능을 유지 시킨다. 피부 상태는 질병 방어에 밀접한 관련이 있고 따라서 작은 비늘 손실과 작은 상처는 2차 감염을 일으키고 성장률저하와 폐사율을 발생 시킬수 있다(Quilhac and Sire 1999). 상처 회복은 수생생물인 어류에 있어 생존과 밀접한 관련이 있는 주요한 건강상의 문제이다. 일반적인 어류의 상처회복은 재상피화(re-epithelialization), 염증(inflammation), 육아조직(granulation tissue)과 fibroblast 형성을 동반하는 세포 증식(proliferation), 조직 재구성(remodeling) 단계로 이루어진다(Richardson et al. 2013). 그러나 동물의 상처 치유능력은 분류군에 따라, 그리고 동일 분류군의 경우 기관의 종류나 조직의 위치에 따라 상당히 큰 차이를 가지고 있다(정문진 and 문명진 1998).

상처 치유는 복잡한 과정으로 아미노산, 산소, 금속, 미량 미네랄, 비타민 등의 에너지를 필요로 하므로 회복 과정에 있어 영양은 중요한 요인이다(Jensen et al.

2015; Kumari et al. 2017). 영양이 결핍되면 섬유성 증식, 콜라겐 합성, 상피화등의 일련의 과정이 방해받음으로써 상처 치료에 악영향을 미친다. 영양 장애는 당뇨병, 내분비질환, 신장, 간 기능 장애로 발생할 수 있는데(Kavalukas and Barbul 2011). 이중 간 질환은 대사장애를 일으키고 어체의 상태를 약하게 만들어, 외부자극에 더 민감하게 반응하게 되므로 상처회복에 있어 악영향을 미칠 것이라 예상된다.

따라서 본 연구에서는 고지방 식이를 이용하여 인위적으로 간장의 조직학적 구조 변화를 인위적으로 유도하고자 하였고 간장의 구조적 변화가 상처회복에 어떤 영향을 미치는지 관찰하고자 하여, 인위적으로 피부 상처를 만들어 간장의 조직학적 변화와 상처의 회복의 관련성 유무를 검토하였다.



II. 재료 및 방법

1. 실험어 관리 및 실험 사료 급이

경남 거제도 통영시 소재의 양식장에서 사육중인 넙치를 실험실로 들고와 2주 동안 시판 배합사료를 공급하면서 순치 하였다. 실험 시작 시 넙치의 무게는 $87.87 \pm 15.27\text{g}$ 이었고, 실험조건에 따라 일반사료급이군(F) , 일반사료급이-상처군(FI), 지방첨가사료급이군(HF), 지방첨가사료급이-상처군(HFI) 네 그룹으로 나누었다. 사육수조는 122cm x 122cm x 30cm 넓이의 PVC사각 수조 4개를 사용하였고, 각 수조에 별도의 외부여과기(EF-1300, Philgreen)를 설치한 뒤 수온 21-23℃를 유지하였으며 매일 수조의 50%에 해당하는 물을 환수해 주었다. 각 수조당 넙치 20마리를 사육하였다.

실험에 사용한 사료는 고압팽창사료(Extruded pellet, EP: 대봉엘에스)를 이용하였으며, 사료 성분표는 Table 1와 같다. 급이량은 국립수산물과학원의 넙치양식기술매뉴얼을 참고하여 어체중(50-100g)과 수온(22℃)에 알맞은 공급량인 어체중의 2%로 설정하였고, HF, HFI 군에 지방첨가 사료를 F, FI군에는 어유를 첨가하지 않은 일반 사료만을 공급하였다. 지방 첨가 방법은 수침시킨 배합사료를 어유에 침적하여 흡착시키고 냉동건조 후 알맞은 양을 공급하였다. 순치 후 총 2주간 실험조건에 알맞은 사료를 어체중 2%양으로 급이하였고, 상처를 낸 뒤 21일 동안에도 급이조건을 유지하였다.

Table 1. Proximate composition of the extrude pellet (EP)

Component	%
Crude protein	55.0
Crude fat	8.0
Crude fiber	5.0
Ash	18.0
Ca	1.0
P	2.7
Others	10.3



2. Wounding과 샘플수집

- Wounding : 간장의 조직학적 관찰을 하였을 때 변화가 나타난 실험사료 급이 2주째 되는 날에 FI, HFI 두 군을 MS-222 100ppm으로 마취한뒤 측선 위의 등쪽에 2mm biopsy로 3개의 상처를 냈다(Figure 1).



Figure 1. Photographs of three wounds made in dorsal skin after Od. (left : wound-induced), right : Carried into the tank after a wound).

- 샘플수집 : 상처를 낸 뒤 1, 7, 14, 21일에 각 군 당 5마리의 샘플을 채취하였다. 샘플 채취 하루전 금식을 하였고 샘플 채취 시 MS-222 100ppm으로 마취 한 뒤 무게, 전장, 체장을 측정하고 미부정맥에서 채혈을 한 뒤 개복하여 장기를 적출하였다. 간중량지수(HSI)를 구하기 위해 간무게를 측정한 다음 각 장기를 10% 중성 포르말린에 고정하였다. 채혈은 진공채혈관 needle holder(BD)와 multi draw 21G needle (Greiner)를 사용하였으며, 채혈된 혈액을 BD Vacutainer SST tube(Becton, Dickinson)에 담고, tube를 3,000g으로 20분간 원심분리후 혈청을 분리하였다. 이 혈청은 당일 분석을 하거나 당일 분석이 어려운 경우 -80도의 디프리지에 보관되었다.

3. 혈액학적 관찰

혈액학적 성상에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 혈청분석기를 이용해 AST, ALT, TP, ALP, GLU, TCHO를 분석하였고 cortisol분석은 cortisol ELISA kit(Enzo, USA.)를 사용 하여 항원, 항체 반응을 유도한 다음 405 nm 파장에서 흡광도를 측정하였으며, 제조사에서 제공하는 매뉴얼에 따라 코티졸 농도로 환산하였다.

4. 조직학적 분석

상처부분과 간을 10%중성 포르말린에 전고정한 뒤 하루 뒤에 동일 고정액으로 후 고정하였다. 후고정 후 24시간내에 수세하고 70%에서 100% 알코올로 순차적으로 탈수한 뒤 Xylene으로 투명화 하여 파라핀을 친화시키는 전처리과정을 진행하였다. 그 후 포매 과정을 거친뒤 4um두께의 박절편을 얻어 목적에 알맞은 염색을 진행하였다.

1) Hematoxylin and Eosin 염색

- 각 장기의 병리학적 연구와 상처부분의 회복과정을 조직학적으로 관찰하기 위해서 H&E(hematoxylin and eosin) 염색을 진행하였다.
- 간의 병리조직학적 평가는 논문(Bernet et al. 1999)을 인용하여 다음과 같은 Tool(Table 2)을 이용하였다.

1. Liver index

$$\text{Liver index} = \sum_{rp} \sum_{alt} (A_{rp alt} \times W_{rp alt})$$

2. Reaction index

$$\text{Reaction index} = \sum_{alt} (A_{rp\ alt} \times W_{rp\ alt})$$

* rp = reaction pattern, alt = alteration, A = score value, W = importance factor.

2) Masson' s trichrome 염색

– 상처 부분의 진피 회복 정도를 확인 하기 위해서 Clear View Staining Trichrome Stain Kit Masson, Aniline Blue(BBC Bio, USA.)를 사용하여 Masson' s trichrome 염색을 실시하였다.

3) Oil red O 염색

– 간세포의 지방 함량을 관찰하기 위해 동결절편기(Leica CM1850)를 이용해 7-8 μm 의 동결 절편을 제작하였고 Oil red O염색을 진행하였다.

– Oil red O stain method

- (1) Store the fixed(10%NBF) tissue in 15% sucrose solution for 2 days, -4°C .
- (2) Cut fresh frozen tissue sections at 7-8 μm thick and mount on slides(silane coating).
- (3) Air dried for up to 90 minutes at room temperature(RT).
- (4) Sections were washed three times in PBS and fixed in calcium formal(4% formaldehyde and 1% calcium chloride) for 1 hour at RT.
- (5) Rinse 60% isoprophyl alcohol.
- (6) Stain in Oil red O solution for 30 minutes.
- (7) Differentiate in 100% isoprophyl alcohol for 2-5 minutes.
- (8) Rinse in 2 changes of distilled water.
- (9) Stain in Mayer' s hematoxylin for 30 seconds.
- (10) Wash thoroughly in running tap water for 3 minutes.
- (11) Place slides in distilled water.
- (12) Mount with aqueous mounting medium.

Table 2. Histopathological assessment tools for liver, (Bernet et al. 1999)

Reaction pattern	Alteration	Importance factor	Score value	Index
Circulatory disturbances	Congestion	Wlc1 = 1	Alc1	Ilc
Regressive changes	Atrophy	Wlr1 = 1	Alr1	Ilr
	Hypertrophy	Wlr2 = 1	Alr2	
	Fatty liver	Wlr3 = 1	Alr3	
Inflammation	Necrosis	Wlr6 = 3	Alr6	Ili
	Hepatitis	Wli3 = 2	Ali3	
	Pericholangitis	Wli6 = 2	ali6	

5. 이미지 분석

- 이미지의 수치화는 모두 Image-Pro Plus 4.5 software(Media Cybernetics, Silver Spring, USA)을 이용하여 측정하였다.

(1) 간세포 크기 측정

간세포 크기는 간 조직의 일정 구역의 면적을 ROS로 설정하여, 설정한 구역의 전체 면적을 측정하고 내부에 위치하는 간세포 수를 카운트하여 하나의 간세포 크기를 도출하였다.

(2) 상처 측정

상처 주위 일정 구역을 ROS로 설정한 뒤 HSI에서 H(색조)를 조절하여 주변 피부와 색이 다른 부분을 추출한 뒤 상처 크기를 측정하였다.

6. 통계학적 분석

실험결과는 SPSS를 이용하여 각 실험군마다 평균과 표준편차를 계산하고 p -value<0.05수준에서 ANOVA test후 Duncan's multiple range test에 의하여 간중량 지수(HSI)와 cortisol은 Turkey HSD multiple range test에 의해 각 실험군 간의 유의차를 검증하였다.

Ⅲ. 결과

1. 생체량 측정

실험 사료 급이 2, 3, 4, 5 주차에 각 군 당 5마리씩 샘플링 하였다. 샘플링구간에서 군을 비교 분석한 결과 무게, 길이, Condition factor에서 유의적인 차이가 나타나지 않았다(Table 3). 간중량지수(HSI)는 지방첨가사료급이군(HF, HFI)이 일반사료급이군(F, FI)보다 2, 3주차에 높게 관찰되었고 특히 4, 5주차에서는 뚜렷한 유의적인 차이를 보였다(Figure 2).



Table 2. Effects of feed oil on weight, standard length and condition factor of olive flounders fed the experimental diet for 2, 3, 4, 5 weeks

Parameters	Group	Sampling time (weeks)			
		2	3	4	5
Weight (g)	HF	95.84±19.34	106.40±15.42	95.70±18.75	118.22±12.64
	HFI	90.50±16.35	98.98±14.54	102.98±6.40	118.98±11.72
	FI	88.04±11.44	111.20±29.24	94.20±21.94	117.78±24.45
	F	82.62±7.31	111.40±17.92	99.48±14.77	127.08±18.69
Standard length (cm)	HF	21.16±1.52	21.9±1.14	21.08±1.38	22.78±0.77
	HFI	20.90±1.28	21.64±1.16	21.28±0.58	22.80±0.39
	FI	20.94±0.79	22.24±1.67	20.72±1.05	22.82±1.42
	F	20.44±0.68	22.04±1.62	21.70±0.87	23.40±1.17
Condition factor ¹	HF	10.06±1.02	10.10±0.69	10.12±0.63	10.00±0.82
	HFI	9.84±0.38	9.72±0.35	10.69±0.42	10.02±0.58
	FI	9.55±0.40	9.91±0.45	10.42±0.92	9.80±0.41
	F	9.66±0.43	10.39±0.89	9.67±0.33	9.88±0.63

All data are presented as means±SD. (n=5, number of tanks per group).

1. Condition factor = (Weight (g) / Standard length (cm) ³) x 100

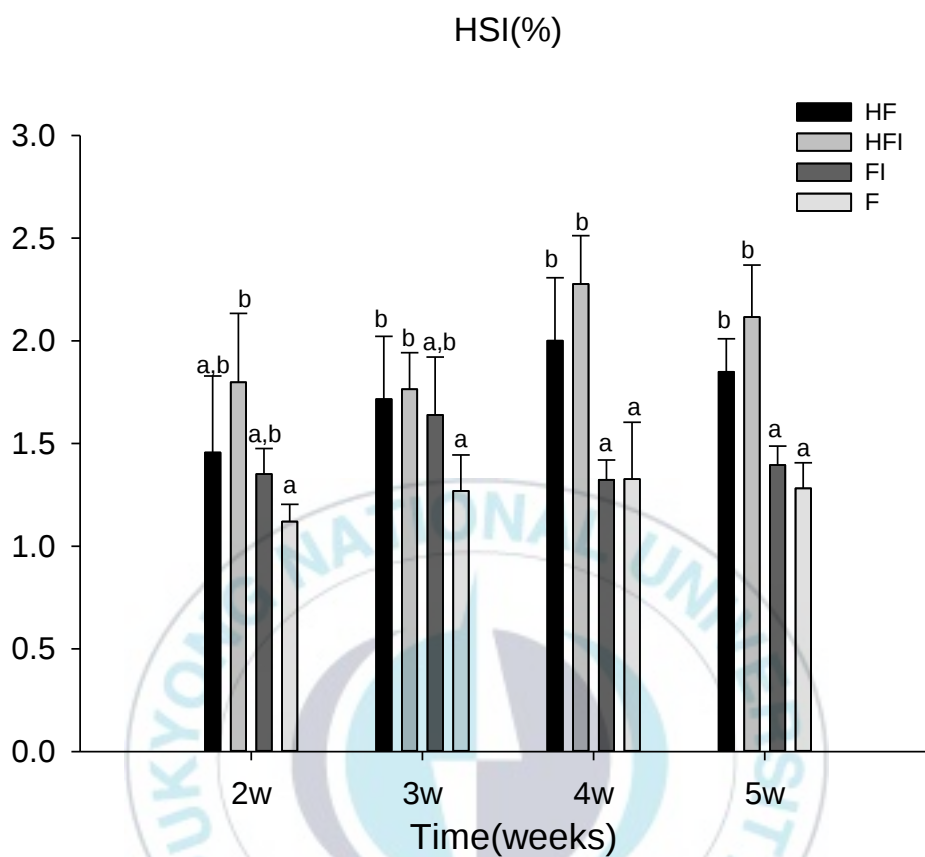


Figure 2. Hepatosomatic index ($\text{HSI} = \text{liver weight (g)} / \text{body weight (g)} \times 100$) in Olive flounder, fed the experimental diet for 2, 3, 4, 5 weeks. Values are means $\pm$ SD. (n=5, number of tanks per group). Small letters (columns) indicate statistical differences between the HF, HFI, FI, F groups ($P < 0.05$).

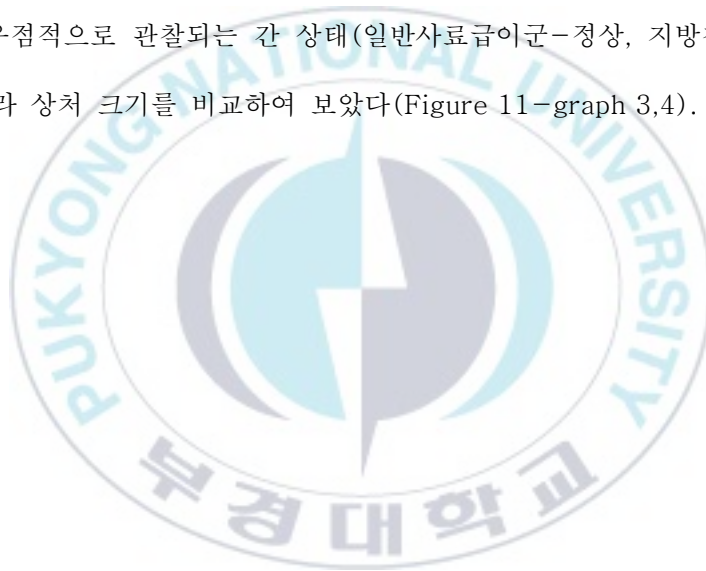
2. 간장의 조직병리학적 측정

실험 사료 급이 2주차에 Oil red O stain을 통해 지방침가 사료급이군(HF, HFI)이 일반사료급이군(FI, F) 보다 많은 지방을 저장하고 있는 모습을 관찰 할 수 있었고(Figure 3), 육안 관찰 시 급이 5주차에 지방침가사료급이군(HF, HFI)에서 크고 백색의 간이 관찰되었다(Figure 4). 간세포 크기와 HIS도 HF, HFI군에서 높게 나타났으며(Figure 5), HSI와 간세포 크기 간의 상관관계를 분석한 결과 HSI와 liver cell size는 강한 양의 상관관계를 가지고 있었고 본 실험에서의 간비대는 간세포의 크기가 커진 결과임을 알 수 있었다.

광학현미경 관찰 시 일반 급이 군(F, FI)은 2주차에 핵은 정상적인 크기를 가지며 비교적 세포질이 호산성화가 되고 간세포판의 형태가 유실되고 무질서한 간세포 배열을 보이는 위축(atrophy)으로 관찰되었으며(Figure 6-A,B, Figure 7-A), 시간이 지남에 따라 점차 정상 간장의 모습으로 변화하는 양상이 관찰되었다(Figure 6-C,D, 7-B,C,D). 지방침가사료급이군(HF, HFI)은 2주차에 정상(Figure 8, 9-A), 비대(hypertrophy)의 소견의 모두 관찰되었고 시간이 지남에 따라 세포질에 지방적(lipid droplet)과 글리코젠(glycogen)으로 공간이 채워져 있어 매우 밝은 염색성을 가지고, 정상 크기의 핵은 주로 동양혈관(sinusoidal capillary)방향으로 편재되어 있으며, 동양혈관이 매우 협소해 지거나 폐색되어 뚜렷이 관찰되지 않는 비대가 우점적으로 관찰되었다(Figure 8, 9-C,D). 그리고 간 비대와 더불어 간세포 곳곳에 동그란 모양의 지방 방울이 관찰되거나 포말성 지방간의 모습이 약간 관찰되었으며 가장자리에 위치한 간세포의 크기가 매우 큰 것을 확인 할 수 있었다.

간의 병리조직학적 수치는 2,3,4주차에서 각 군별로 유의적인 차이가 나타나지

않았고 5주차에 HFI군이 유의적으로 높은 수치를 나타냈다(Figure 10). 각 실험 군에서 간의 상태를 분류해 보았을 때(Figure 11-graph 1,2), 일반사료급여군은 급이 2주차에 위축 7마리, 정상 3마리가 관찰되었고, 3주차에는 위축 4, 정상 6, 4주차에는 위축3, 정상 1, 5주차에는 위축 1, 정상 9마리로 관찰되어 급이 할수록 정상 간 상태가 많이 관찰되었다. 반면 지방첨가사료급여군은 2주차에 위축 2, 정상 5, 비대 3가 관찰되었고 급이를 진행 함에 있어 3주차에 정상 3, 비대 7, 4주차에 비대 10, 5주차에 정상 3, 비대7로 점차 비대가 많이 보이는 양상을 띄었다. 따라서 4장에서 각 실험군에서 우점적으로 관찰되는 간 상태(일반사료급여군-정상, 지방첨가사료급여군-비대)에 따라 상처 크기를 비교하여 보았다(Figure 11-graph 3,4).



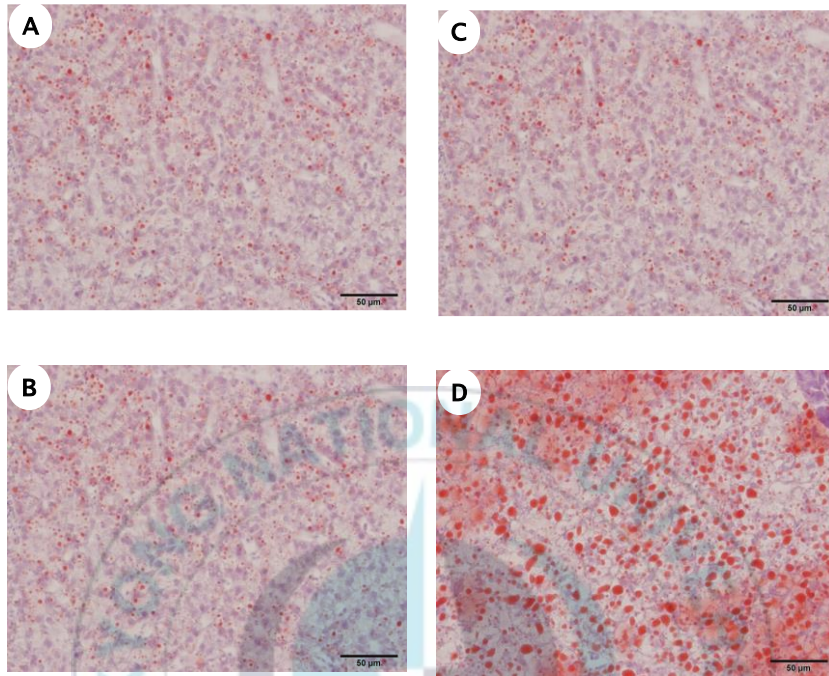


Figure 3. Photomicrographs show liver of four groups fed the experimental diet for 2weeks, A: F, B: FI, C: HF, D: HFI, (Oil red o stain x 400).

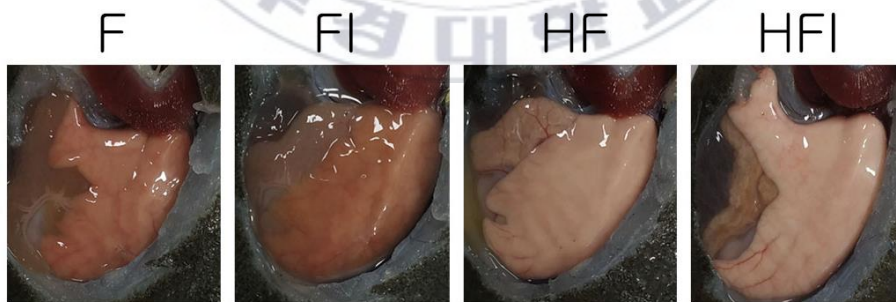


Figure 4. Photographs show liver of four groups(F, FI, HF, HFI) fed the experimental diet for 5weeks.

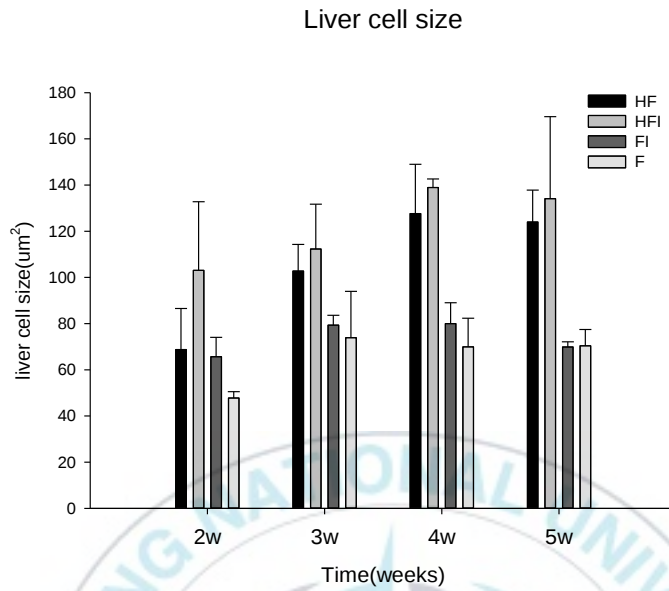


Figure 5. Liver cell size(um²) in Olive flounder fed the experimental diet for 2,3,4,5 weeks. Values are means $\pm$ SD. (n=5, number of tanks per group).

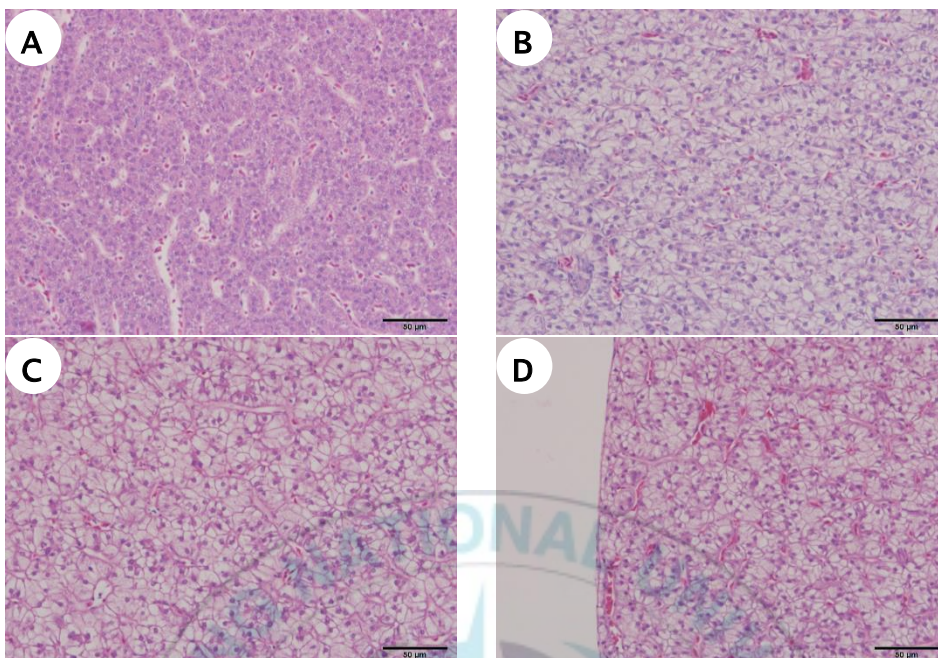


Figure 6. Photomicrographs show liver with F groups olive flounder fed the original diet for A: 2, B: 3, C: 4, D: 5 weeks, (H&E stain x 400).

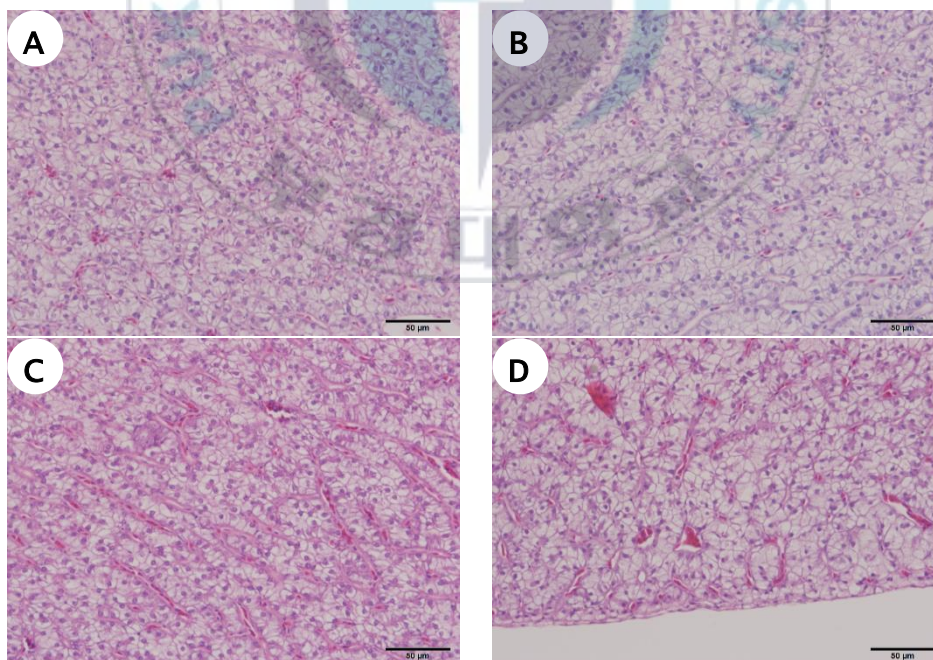


Figure 7. Photomicrographs show liver with FI groups olive flounder fed the original diet for A: 2, B: 3, C: 4, D: 5 weeks, (H&E stain x 400).

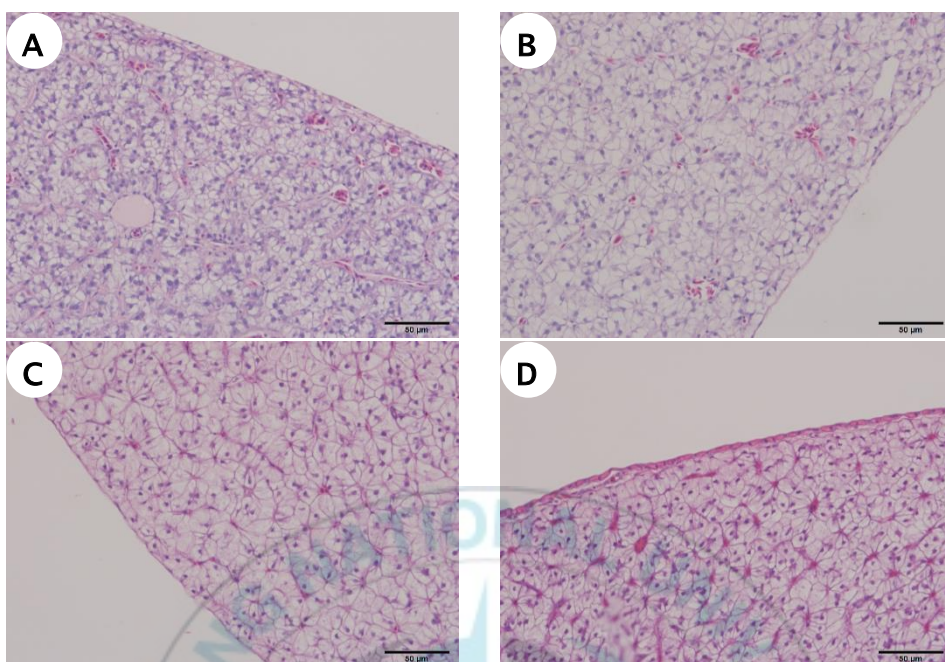


Figure 8. Photomicrographs show liver with HF groups olive flounder fed the experimental diet for A: 2, B: 3, C: 4, D: 5 weeks, (H&E stain x 400).

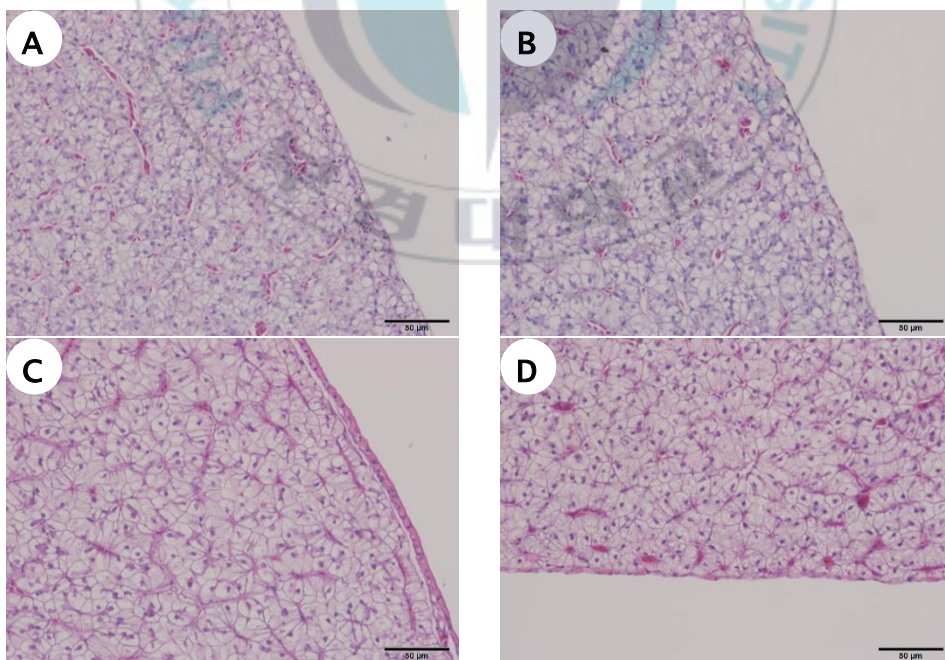


Figure 9. Photomicrographs show liver with HFI groups olive flounder fed the experimental diet for A: 2, B: 3, C: 4, D: 5 weeks, (H&E stain x 400).

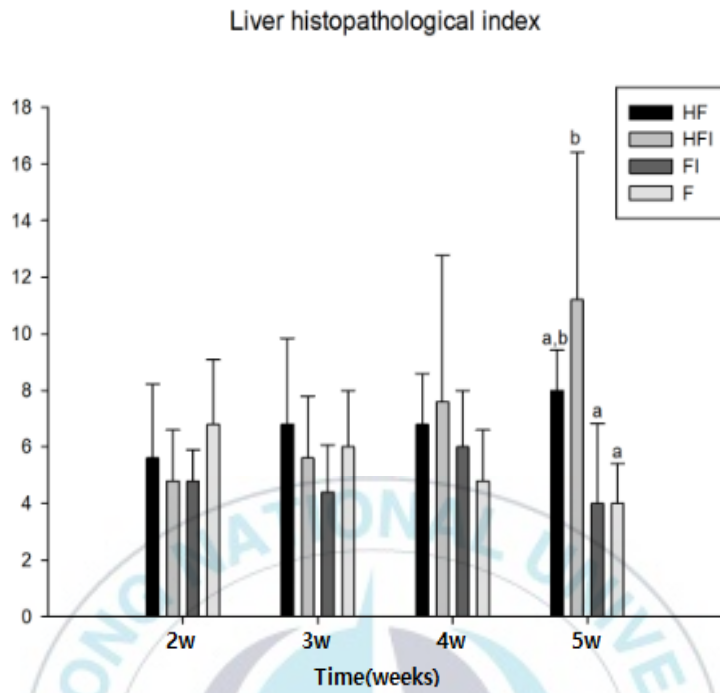


Figure 10. Liver histopathological index, Olive flounder fed the experimental diet for 2,3,4,5 weeks. Values are means $\pm$ SD. (n=5, number of tanks per group).

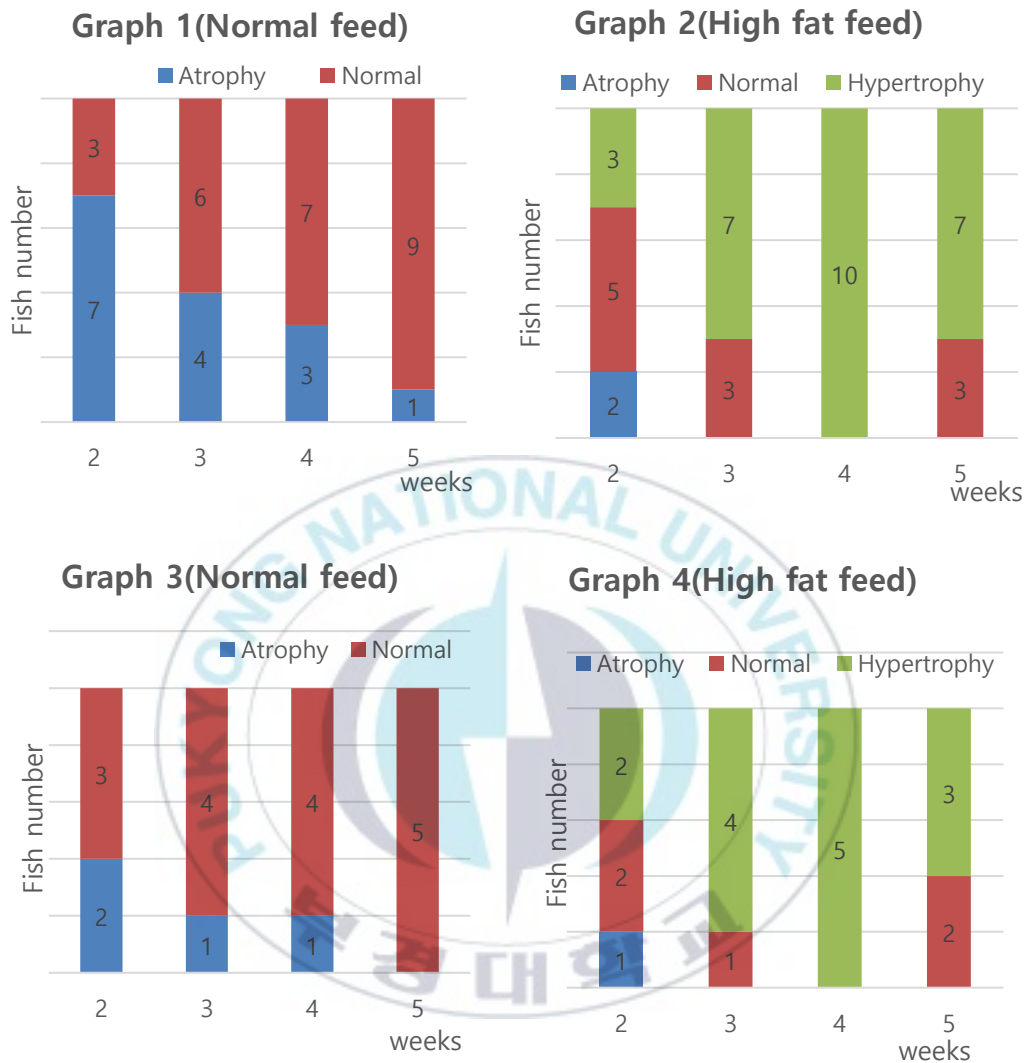


Figure 11. Liver status classification, Graph 1: normal feed group in the whole sample, Graph 2: High fat feed group in the whole sample, Graph 3: normal feed group in the wound sample, Graph 4: High fat feed group in the wound sample.

3. 혈액학적 관찰

혈청학적 인자들을 같은 샘플링시점에서 군 별로 비교분석 한 결과 Table 4로 나타났다.

AST는 1DPI(1days post-injury)에서 HFI, FI군에서 높게 나타났으며 나머지 시점에서는 유의적인 차이가 나타나지 않았다.

ALT는 1DPI에서는 HF, HFI가 높았지만 21DPI에서는 FI, F가 높게 나타났다.

ALP는 1DPI에서는 HF, HFI가 높은 경향을 보였고 14DPI에서 HF, HFI, F가 높은 경향을 보였으며 21DPI에서는 HF군이 높게 나타났다.

Glucose는 14DPI에서 HF군이 높게 나타났다.

Total cholesterol은 1DPI, 7DPI에 HFI, HF, FI, F순으로 높았고 14DPI, 21DPI에는 HF, HFI, F, FI 21DPI에는 HF, HFI, F, FI순으로 높게 나타났다.

Total protein은 1DPI에서 HF, HFI가 F, FI에 비해 유의적으로 높게 나타났고 다른 시점에서는 유의적인 차이가 나타나지 않았다.

AST/ALT는 1DPI와 14DPI에서 FI군이 높게 나타났고, 7DPI에서는 유의적인 차이 21DPI에서는 HF, HFI가 높은 경향을 보였다(Figure 9).

Cortisol은 1,14,21 DPI에서는 군간의 차이가 없었고 7DPI에서만 HFI가 가장 높게 관찰되었다. (Figure 10).

Table 4. Effects of feed oil on serological characteristics of olive flounder, fed the experimental diet for 2, 3, 4, 5 weeks

Parameters	Group	sampling time (weeks)			
		2	3	4	5
AST(U/L) ¹	HF	41.2 ± 11.1 ^a	59.2 ± 27.22	39.6 ± 11.08	48.4 ± 25.59
	HFI	75.6 ± 24.71 ^b	37.2 ± 9.23	29.6 ± 4.56	59.6 ± 45.81
	FI	77.6 ± 24.43 ^b	35.6 ± 15.32	51.6 ± 31.48	66.4 ± 62.73
	F	33.6 ± 4.77 ^a	45.6 ± 47.32	35.6 ± 8.41	30 ± 8
ALT (U/L) ²	HF	8 ± 1.41 ^c	4.8 ± 1.1	8 ± 2.83	3.2 ± 1.79 ^a
	HFI	6.4 ± 1.67 ^{b,c}	4.8 ± 1.79	8.8 ± 1.1	4.8 ± 1.1 ^{a,b}
	FI	4 ± 1.41 ^a	4.4 ± 0.89	6.8 ± 1.1	6 ± 1.41 ^b
	F	5.6 ± 1.67 ^{a,b}	5.6 ± 1.67	6.8 ± 1.1	5.2 ± 1.1 ^b
ALP (U/L) ³	HF	496.4 ± 271.79 ^{a,b}	289.2 ± 92.17 ^b	385.6 ± 188.52	243.6 ± 44.98 ^b
	HFI	694 ± 266.75 ^b	288.8 ± 74.68 ^b	230.8 ± 52.3	180 ± 12.08 ^a
	FI	304 ± 174.29 ^a	155.6 ± 12.99 ^a	262.4 ± 256.08	162.4 ± 71.48 ^a
	F	218.8 ± 102.71 ^a	275.2 ± 138.43 ^{a,b}	173.6 ± 32.51	155.6 ± 23.68 ^a

All data are presented as Mean ± SD. Small letters (a,b,c) indicate statistical differences between the HF, HFI, FI, F groups; P < 0.05 (n=5, number of tanks per group), 1. AST(Aspartate aminotransferase) 2. ALT(Alanine aminotransferase) 3. ALP(Alkaline phosphatase).

Continue

Parameters	Group	sampling time (weeks)			
		2	3	4	5
Glucose (mg/dL)	HF	48.4 ± 10.43	44 ± 11.58	80.4 ± 30.77 ^b	96 ± 81.65
	HFI	52.4 ± 18.08	66.8 ± 32.73	50.4 ± 6.39 ^a	42.4 ± 11.95
	FI	56.8 ± 11.1	58.8 ± 48.86	47.2 ± 10.06 ^a	38 ± 8.25
	F	68 ± 28.91	60.4 ± 14.17	51.2 ± 9.01 ^a	40.4 ± 7.92
Total cholesterol (mg/dL)	HF	327.6 ± 109.52 ^{a,b}	318 ± 37.04 ^b	416.4 ± 36.51 ^c	369.2 ± 23.52 ^b
	HFI	367.6 ± 142.64 ^b	356.4 ± 36.12 ^b	358.4 ± 63.16 ^{b,c}	347.6 ± 47.23 ^b
	FI	236 ± 26.83 ^{a,b}	247.6 ± 27.84 ^a	268 ± 48.08 ^a	277.6 ± 41.34 ^a
	F	221.2 ± 77.3 ^a	260.4 ± 53.39 ^a	302 ± 56.37 ^{a,b}	341.6 ± 31.6 ^b
Total protein (g/dL)	HF	9.08 ± 1.01 ^b	7.24 ± 0.48	7.44 ± 0.43	6.28 ± 0.23
	HFI	8.92 ± 1.29 ^b	7.36 ± 0.43	6.92 ± 0.3	6.48 ± 0.33
	FI	7.4 ± 0.73 ^a	6.88 ± 0.23	6.76 ± 0.68	6.52 ± 0.44
	F	7.12 ± 1.14 ^a	7.32 ± 0.66	7.32 ± 0.87	6.44 ± 0.59

All data are presented as Mean ± SD. Small letters (a,b,c) indicate statistical differences between the HF, HFI, FI, F groups; P < 0.05 (n=5, number of tanks per group).

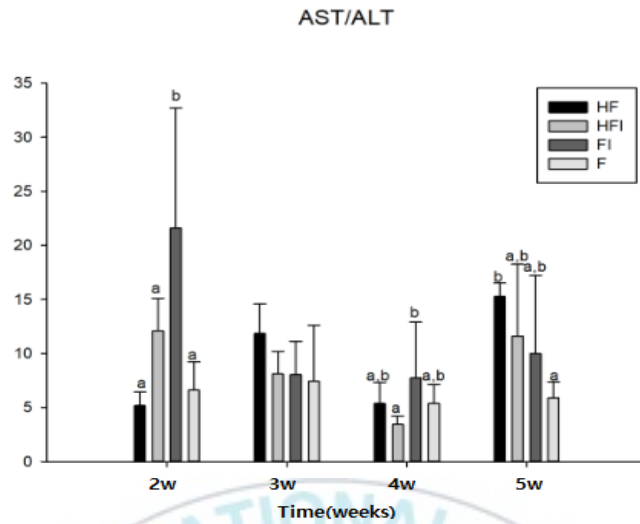


Figure 12. AST/ALT (Aspartate aminotransferase/Alanine aminotransferase) in Olive flounder, fed the experimental diet for 2,3,4,5 weeks. Values are means $\pm$ SD. (n=5, number of tanks per group). Small letters (columns) indicate statistical differences between the HF, HFI, FI, F groups ($P < 0.05$).

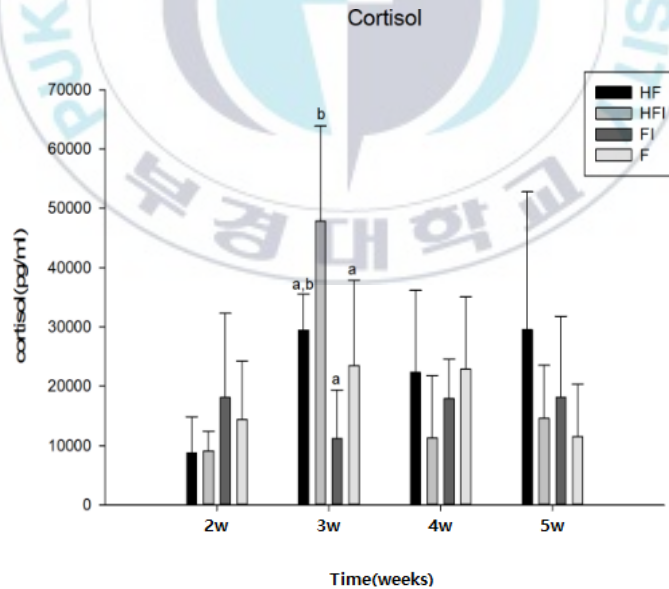


Figure 13. Cortisol in Olive flounder, fed the experimental diet for 2,3,4,5 weeks. Values are means $\pm$ SD. (n=5, number of tanks per group). Small letters (columns) indicate statistical differences between the HF, HFI, FI, F groups ($P < 0.05$).

4. 상처회복 관찰

1) 상처 크기와 상피세포 두께

상처 외형(Figure 14)에 주변 피부와 색소가 다른 부분을 조직학적으로 보았을 때, 진피(dermis)손상에 의해 색소 체계가 완전히 회복 되지 않았고 아래에 결합조직이 침윤되어 있었으므로 scar로 판단하였다. 따라서 이 부분의 면적을 측정할 결과 두 군 모두 7일차에 가장 넓은 면적으로 측정되었고 이후 회복 하였지만 21일 차에도 완전히 회복 되지 않았으며 상처의 흔적이 관찰되었고 모든 구간에서 유의적인 차이는 나타나지 않았다(Figure 15). 상피세포의 두께는 1일차에 정상 상피보다 얇아졌다가 7일차에 가장 높게 두꺼워졌고 이후 점차 두께가 감소하였지만 21일차에 정상두께보다는 두꺼운 모습이 확인되었고 두 군 사이에서는 큰 차이가 없었다(Figure 16).

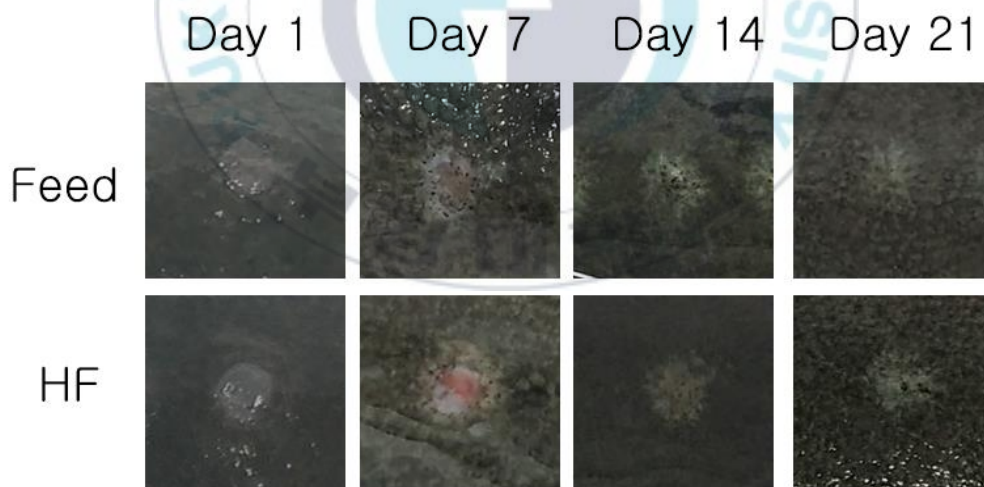


Figure 14. Photographs show representative wounds with time after wound performance in two groups(FI, HFI).

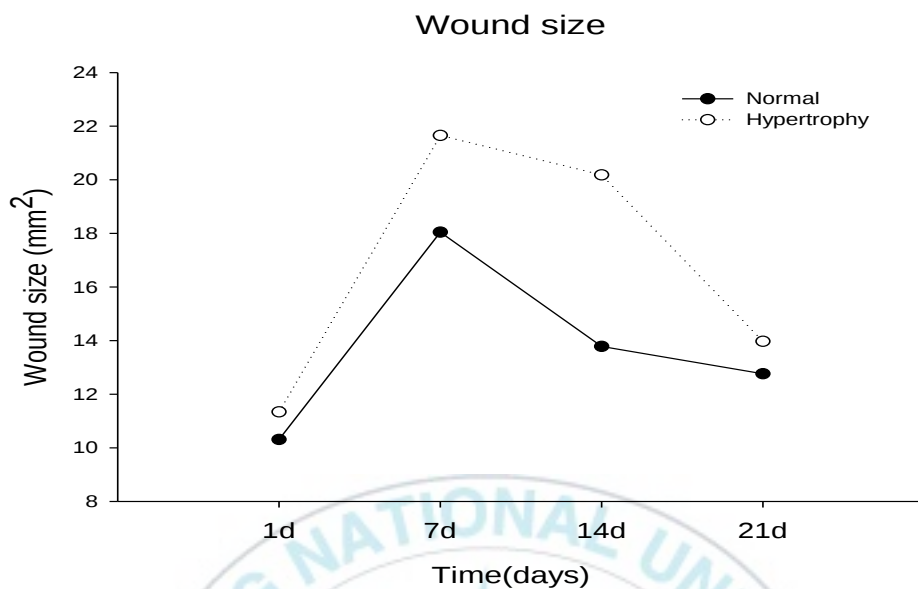


Figure 15. Wound size in two groups (FI, HFI). Values are means $\pm$ SD. (n=5, number of tanks per group).

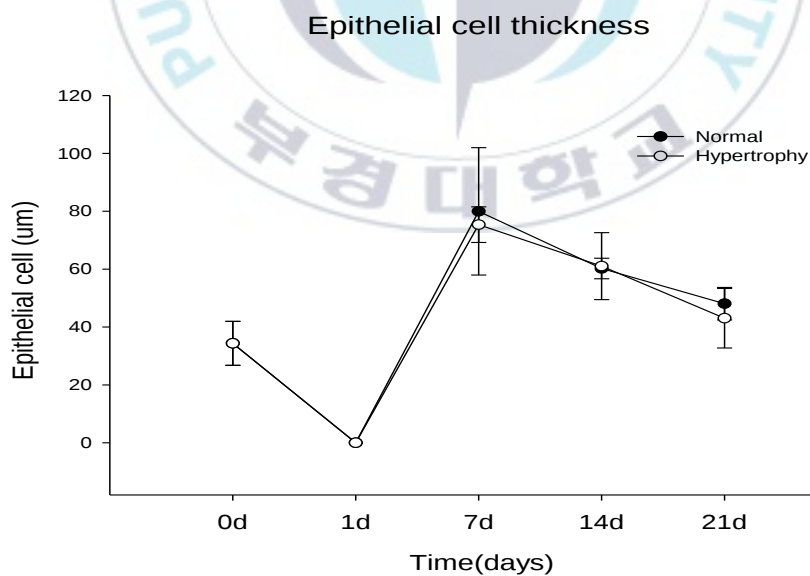


Figure 16. Epithelial cell thickness in two groups (FI, HFI). Values are means $\pm$ SD. (n=5, number of tanks per group).

2) 상처 회복 과정

상처 부분을 조직학적으로 보았을 때, 간 비대와 간 위축 군에서 모두 같은 시간대에 동일한 상처회복 과정을 거쳤고, 상처회복 과정에서 나타나는 특징적인 병변에도 차이가 없었으며, 각 시간대에 대한 상처회복 과정은 다음과 같았다.

(1) 상처 유도 후 1일 : 육안 관찰 시 상처낸 부분에서 불투명한 흰색의 삼출물이 차올랐고, 그 주변의 피부가 상처모양을 따라 융기되었다. 조직학적으로는 진피(dermis)가 파괴되고, 파괴된 부분을 삼출물(exudate)과 혈구들이 채우고 있었다. 윗부분은 상피세포가 덮고 있었는데 완벽하게 상피세포가 덮여있진 않았으며, 재상피화된 부분의 상피세포는 주변상피세포와 약하게 결합을 하고 있는 해면화(spongiosis)가 관찰되었다. 상처 주변에 융기부위는 부종(Edema)으로 관찰되었고, 부풀어오른 곳은 H&E염색으로는 관찰되지 않는 물질(ex. 물)이나 삼출물로 차있었다. 삼출물 내부에서 thrombocyte 응집소가 관찰되었고, 손상된 근육이 괴사되기 시작하는 초기 근육괴사가 관찰되었다(Figure 17).

(2) 7일차 : 융기되었던 부분이 가라 앉고 돌출된 삼출물이 보이지 않았다. 상처수축이 진행되었고 여전히 닫히지 않은 중앙 부분의 주위로 검은색의 작은 점 여러개가 상처 라인을 따라 나타났다. 현미경으로 관찰 시 상처부분은 표피세포로 완전히 덮여있었고, 진피층은 완전히 회복되지 않았다. 상처로 인한 빈공간은 삼출물이나 Macrophage, Neurtophil등의 염증성 인자들로 메워져 있었고, 활성화된 fibroblast가 관찰되었다. 근 괴사가 진행되어 손상된 근육은 형태를 알아보지 못할 정도로 녹아있었고, 정상 근육조직 인접부위에서는 새로운 근세포가 생성되고 있었고, 다수의 신생혈관(Angiogenesis)도 관찰되었다(Figure 18).

(3) 14일차 : 상처부분이 완벽하게 닫혔다. 그러나 주변 피부에 비해 색이 연하고,

상피세포의 조직화가 완전히 일어 나기 않아서 정상보다 두껍고 약한 상피의 모습이 관찰되었다. 7일차에 관찰된 검음색 작은 작은 점들이 상처 중앙부분으로 모여들었다. 진피층은 콜라겐(collagen)이 합성되어 회복 되었지만 정상 진피에 비해 두껍고 성긴 모습으로 관찰되었다. 삼출물이 사라지고 대신 그 빈공간을 결합조직이 채웠다. 상처 부분의 표피에는 매우 큰 Melanomacrophage centers(MMCs) 가 보였고 육아조직(Granulation tissue)과 새로 만들어진 근조직이 관찰되었다(Figure 19).

(4) 21일차 : 색소가 어두워지고 주변 피부와 비슷해졌다. Masson' s trichrome염색 관찰시 진피층의 파란색이 더욱 진해졌다. 하지만 상처부분은 여전히 진피층이 두껍고, 결합조직이 침착되어있었다. 표피에 커다란 MMCs 가 존재하고, 치밀한 결합조직과 염증소가 관찰되었다. 이 시기에 특징적으로, 상처 아래부분에 매우 커다란 MMCs 가 생성되었고 비늘 주머니(Scale pocket)이 만들어져 새로운 비늘이 생성되기 시작했다(Figure 20).

IV. 고찰

본 연구에서 수행한 고지방급이를 통한 간장의 변화를 조사하고 더불어 혈액학적 성상의 변화와 상처 회복을 관찰한 시도는 항상성 장기인 간과 면역의 상호관계를 보았다는 점에서 매우 큰 의의가 있다고 볼 수 있다. 특히 간장의 병변이 질병 발생 전에 숙주에서 나타나는 기질적 내지 전구성 병변으로, 이차적인 각종 병원체에 의한 질병 감수성 증가 내지 면역성 저하와 관련성이 깊을 것이라 사료된다.

실험적으로 고지방식이를 통해 인위적으로 간 비대를 유도하였다. 간 비대는 지방 첨가사료를 급이하기 시작한 2주째에 나타나기 시작하였고, 급이 4, 5주에 대조군과 HSI에서 유의적인 차이가 났으며, 5주에 liver cell size와 HSI는 4주차의 상태를 유지한 상태로 관찰되었다. (이무근, 2008)에서 지방간 즉, 간 내 지방의 증가 시 간 무게와 HSI수치는 유의적으로 증가한다고 서술하고 있고 (황세명, 2015)에서도 그 의견을 뒷받침해주는 내용을 서술하고 있는 걸 보아, HHS는 일반사료 급이군에서 일정한 상태를 유지하는 반면 지방첨가사료급이군은 많은 지방 섭취로 인해 증가하였다고 사료된다. 영양은 간 상태와 매우 밀접하게 관련되어 있으며 급이되는 구성성분에 따라서 간의 상태가 악화되기도 하고 개선되기도 한다(황세명 2015). 혈중 유리 지방산은 주로 지방세포에서 분비되어 알부민 등의 혈장 단백질과 결합하여 간세포 내로 유입된다. 과도한 영양 공급과 비만은 혈중 유리 지방산의 농도를 높여 지방간을 유발하는 것으로 잘 알려져 있다(심재준 2018).

Oil red O 실험 결과 지방첨가사료급이군의 간세포 안에 지방성 물질이 많이 축적되어 있는 것을 확인 할 수 있었고 광학현미경상 H&E 염색에서 핵이 동양 혈관 방향으로 편재해 있고 글리코겐과 지방적으로 채워져서 세포질이 밝게 염색되어 비대

로 판단되었다. 간세포의 비대는 글리코겐과 중성지방이 간세포 내 과다축적함에 따라 나타난다. 간세포의 비대는 급이 2주차에 일부 어류에서 관찰되었으며 3주차에 정상 3, 비대 7, 4주차에 비대 10, 5주차에 정상 3, 비대 7 비율로 급이를 진행함에 있어 비대 소견이 많이 관찰되었다. 간세포의 비대는 글리코겐과 중성지방이 간세포 내 과다축적함에 따라 나타나므로 이러한 결과는 인위적으로 지방을 첨가하여 급이하였기 때문에 나타난 현상으로 보여진다.

이와 같이 비대 세포로 구성된 간 조직은 세포내 지방적에 의한 세포내 구조 이상과 세포의 용적증가에 따른 세포외 구조 이상(동양혈관과 Disse space 압박 내지 폐색)이라 생각된다. 비대 간세포는 지방적에 의해 세포핵이 편재되며 세포골격이 왜곡되는 세포내 구조 이상이 나타난다. 세포골격은 간세포의 모양을 유지하며 분자물질의 세포내 이입과 세포외 유출에 관여할 뿐만 아니라 소포와 미소관 형성의 역할을 하므로 세포골격이 왜곡되면 세포 대사에 지장이 초래될 수 있을 것이다. 그리고 세포외 구조이상은 흡수, 배설 및 혈관 순환에 좋지 않은 영향을 미친다고 할 수 있다.

일반적으로 비대란 육안적인 소견이나 각각의 세포에 대해 쓰일 수 있는 병리학적 용어이다. 본 연구에서의 넓치 비대간과 간세포의 비대는 HSI, 간세포크기를 상관분석한 결과 동일하다고 판단할수 있었다.

그래서 지방첨가사료급이군(지방 함유 27%)에서 영양 과다에 의해 나타나는 간 비대를 확인하였고, 혈액학적 변화를 관찰해 보았다.

혈액학적 성상 결과 AST 수치가 1일차에 HFI, FI에서 높았다. 골격근은 LDH, AST, ALT, Creatine kinase 효소들을 포함하며, 특히 AST는 간장 외에 골격근, 심장, 신장에도 많이 포함되어 근 괴사 발생시 혈액으로 방출되므로 골격근 상처 발생시 AST, ALT가 높은 수치로 나타난다(Rahul A 2005). 따라서 Injury 그룹에서 1일

차에 높은 AST수치를 보였지만 이후 샘플링 기간에서는 감소한 것을 보았을 때 1일 차 AST수치는 골격근 파괴로 인한 효소 누출에 의한 것으로 생각된다.

총 콜레스테롤 수치는 급이 2주차에 지방첨가사료급이군(HF, HFI)에서 높게 나타났고 3주차에 일반사료급이군에 비해 유의적으로 높은 수치로 나타났다. 혈액내 총 콜레스테롤 수치는 지방 급이와 간장의 활성화에 큰 영향을 받으며, 지방 급이로 인해 지방첨가사료급이군이 높은 콜레스테롤 수치가 관찰되었고 2주 3주, 4주, 5주차 모두 높은 상태를 유지하였다. 또한 모든 어체의 간장 상태가 비대인 급이 4주차에 가장 높은 총 콜레스테롤 수치가 관찰되었다. 하지만 5주차에 HFI군 347.6 ± 47.23 과 비슷한 수치(341.6 ± 31.6)가 F군에서 나타났으며 (정요한 등 2010)에 넓치 총 콜레스테롤은 355.9-436.20으로 어종의 크기에 따라 차이가 있겠지만 다른 실험 데이터를 합쳐보았을때 238-415수치가 나타나는 것으로 보아 본 실험에서 측정된 값 모두 위 범위에 포함되어 정상범위에 속한다고 생각된다.

다른 혈액학적 항목들은 유의적인 차이가 없었고 변동하며 정상상태를 유지하려는 모습이 관찰되었다. 그러나 HF, F군 만 비교하였을 때 AST, ALT, ALP, Glucose항목에서 HF군이 변동의 폭이 크게 관찰되었다. 따라서 본 실험에서의 고지방 급이가 혈액학적으로 영향을 주었으나 정상을 유지하려는 양상을 보였기에 함께 나타난 간병변이 간의 기능상실 까지 이어지지 않은 것으로 사료된다. 경골 어류는 고등척추동물에 비해 간장 내 혈액순환이 매우 느린 것으로 알려져 있고, 주요 양식 어류의 혈액성분에 관한 연구가 있긴 하지만 종마다 값이 다르고 계절적 변동, 질병, 수질환경에 따라 혈액학적 분석의 차이가 있기에 일반화하기에 어려움이 많다. 이러한 결과로 보아 혈액학적 분석을 통해 어류의 간 상태를 확인하기는 어렵다고 생각하며 위축, 정상, 비대 상태는 간이 기능을 수행함에 있어 큰 차이가 없다고 생각된다.

앞선 결과에서 일반사료급이군과 지방첨가사료급이군에서 우점적으로 관찰된 간 상태를 기반으로 정상, 비대로 나눈 뒤 상처회복과정을 관찰하여 실험군의 면역성을 평가하였다.

상처회복에 있어서는 상피세포의 두께는 두군(일반사료급이군-정상, 지방첨가사료급이군-비대)에서 차이가 없었고 동일하게 1일차에 재상피화가 진행되어 상피가 소실된 부분이 관찰되었고 이후 7일차에 정상 상피에 비해 크게 두꺼워졌다가 얇아졌지만 여전히 정상보다는 두꺼운 상피를 가지고 있었다. 상처회복 과정 또한 1일차에 삼출물, 재 상피화가 나타났고, 7일차에 염증성 삼출물로 바뀌며, 표피세포가 완전히 상처부위를 덮었다. 14일차에는 삼출물이 없어지면서 생긴 빈공간을 육아조직이 채우고 21일차에 비늘이 형성되기 시작하는 전체적인 상처회복 과정은 같은 시간대에 동일하게 관찰 되어 간 상태에 의해 상처회복이 지연되지는 않은 것으로 사료된다. 상처회복 과정은 zebrafish(논문 인용)에서 나타나는 과정과 동일하게 나타났으나 어종과 상처 크기의 차이로 인해 회복 양상의 시점 차이가 있었고, 본 실험을 진행함에 앞서 예비 실험을 진행하였을 때 1d에 삼출물의 형성은 관찰되지 않았으므로 알부민성 삼출물의 형성은 항상 관찰되는 양상은 아니라 생각된다. .

본 실험에서는 상처 크기에 있어서도 유의적인 차이는 나타나지 않았으나, 7, 14일차에 비대군이 상처가 크게 나타났는데, 이 때의 상처 크기는 상처 내부에 수축되는 크기가 아닌 부종에 의한 영향으로 손상받은 epithelial cell이라는 점에서 간 비대군이 부종에 영향을 받은 것으로 생각되지만 명확한 원인은 본 실험에서 확인하지 못하였다. 대서양 연어의 경우 스트레스 호르몬인 cortisol이 진피 재생 과정을 지연시킨다는 사실에 비추어 보았을 때 7일차에 높은 cortisol을 지닌 지방첨가사료군이 상처회복이 관련이 높은 것이라 생각된다.

간장의 조직학적 변화가 기능장애를 일으켜 상처회복에 영향을 미칠것이라 예상하였으나, 본 실험에서 나타난 간 비대는 상처회복에 있어 큰 영향을 미치지 않은 것으로 나타났다. 이는 간 비대가 간장의 기능 장애까지 이어지는 병변이 아니기 때문에 상처부위에 까지 영향을 미치지 못한 것으로 생각된다. 지방간 등과 같이 기능 이상을 일으킬 정도로 구조가 더욱 심하게 변화된다면 상처 회복이 지연될 가능성이 높을 것이라 생각되며, 더욱 깊은 연구가 필요할 것으로 사료된다.

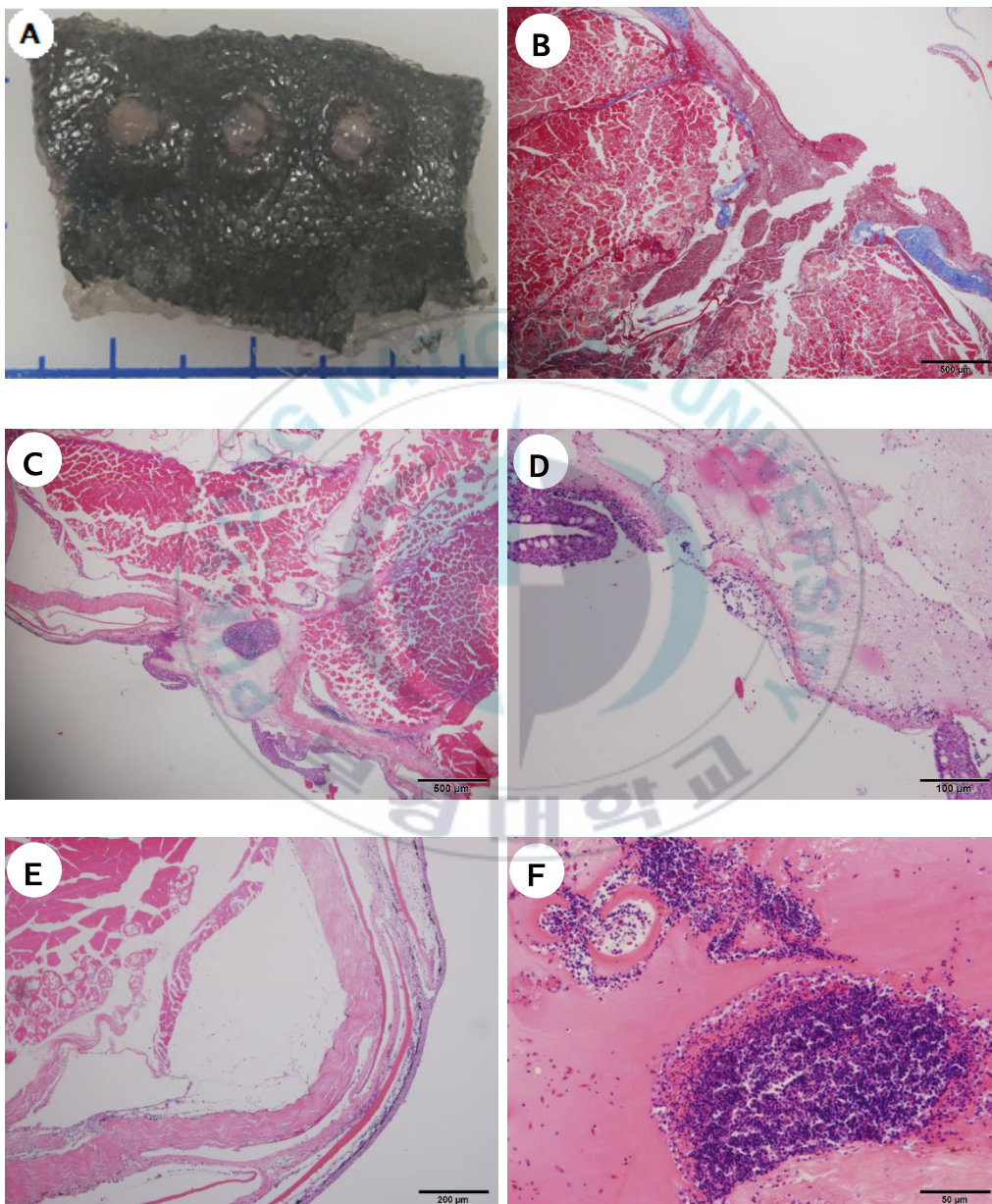


V. 요약

지금까지 의학계는 질병제어를 위하여 숙주관리보다는 주로 병원체와 환경요인의 영향에 대하여 관심을 가져왔다. 이는 건강하다는 본래의 의미에 관하여 미묘한 혼돈이 있어 왔기 때문이기도 하다. 본연구는 간장에 초점을 맞추어 현장에서 주로 관찰되는 간 상태를 재현하고 간 상태에 따른 어체의 상태와 건강을 규명하고자 하는데 그 목적이 있었다. 지방첨가사료급이를 통해 간 비대를 유발하였고 혈액학적 성상을 분석하고 간 상태에 따라 상처회복 차이를 관찰하였다. 본 실험에서 혈액학적 성상은 급이와 외부자극에 의해 영향을 받았지만 정상상태를 유지하고자 하는 모습을 관찰할 수 있었고 간장 상태에 의한 큰 차이는 관찰되지 않았다. 상처회복에 있어서도 상처회복 단계, 상피세포 두께, 상처크기 모두 간 비대와 정상에서 차이가 없었다. 따라서 간 비대 상태는 간장의 기능적 손상까지 유발되지 않는 것으로 사료되고, 어체에 건강에 있어서도 영향을 미치지 않는 것으로 사료되지만 참고문헌을 인용하였을 때 다른 간 병변으로 이어질 가능성이 높다는데 의의가 있다.

본 논문은 현장에서 주로 관찰되는 간 상태를 가진 어류에 관한 혈액학적, 상처회복의 기초자료를 마련하고 앞으로 어류에서 인위적인 간장 병변을 유도하는 실험에 선행자료를 제공할 수 있을 것으로 사료된다.

VI. 상처회복그림 및 그림 설명



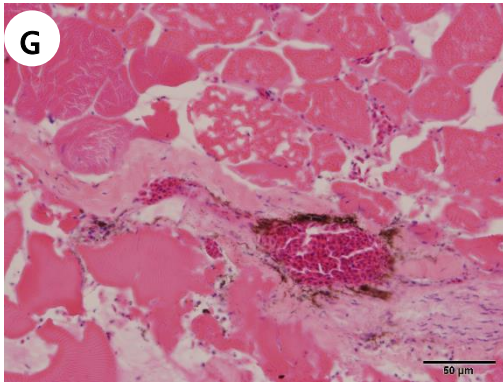
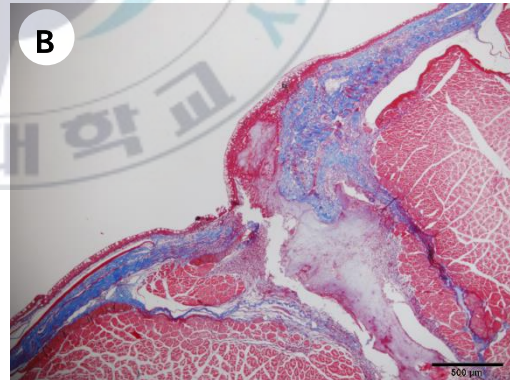
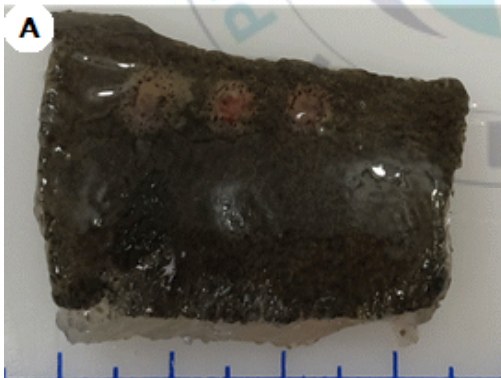


Figure 17. At 1days post wounding. (A) Photographs of wound healing at 1days after injury. (B) Masson' s trichrome staining of longitudinal sections(x40). (C) Hematoxylin and eosin (H&E) staining of longitudinal sections(x40). (D–G) H&E stain, (D)re–epithelial(x200), (E) Edema(x100), (F) Trombocyte aggregation(x400), (G) skeletal muscle necrosis(x400).



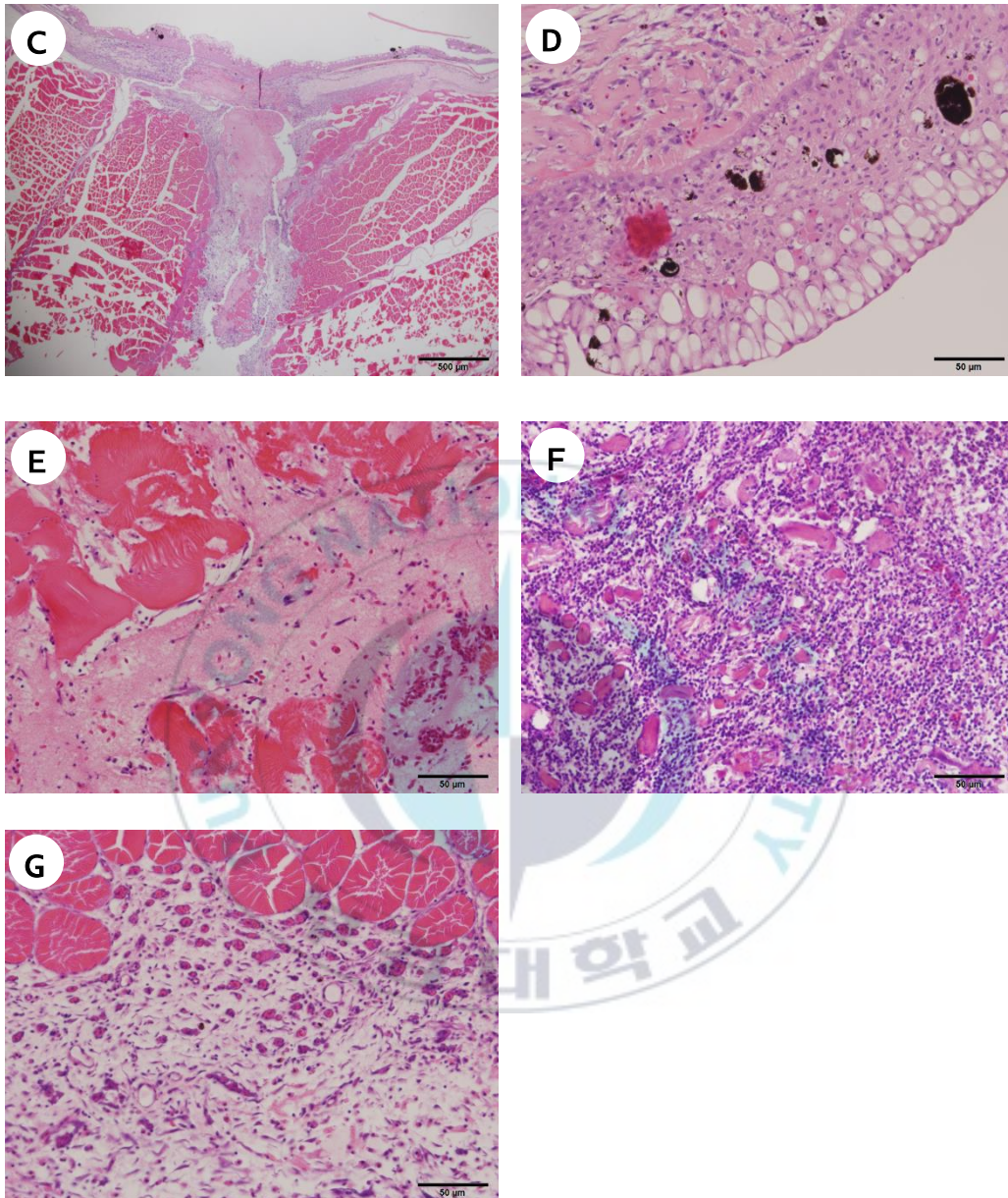
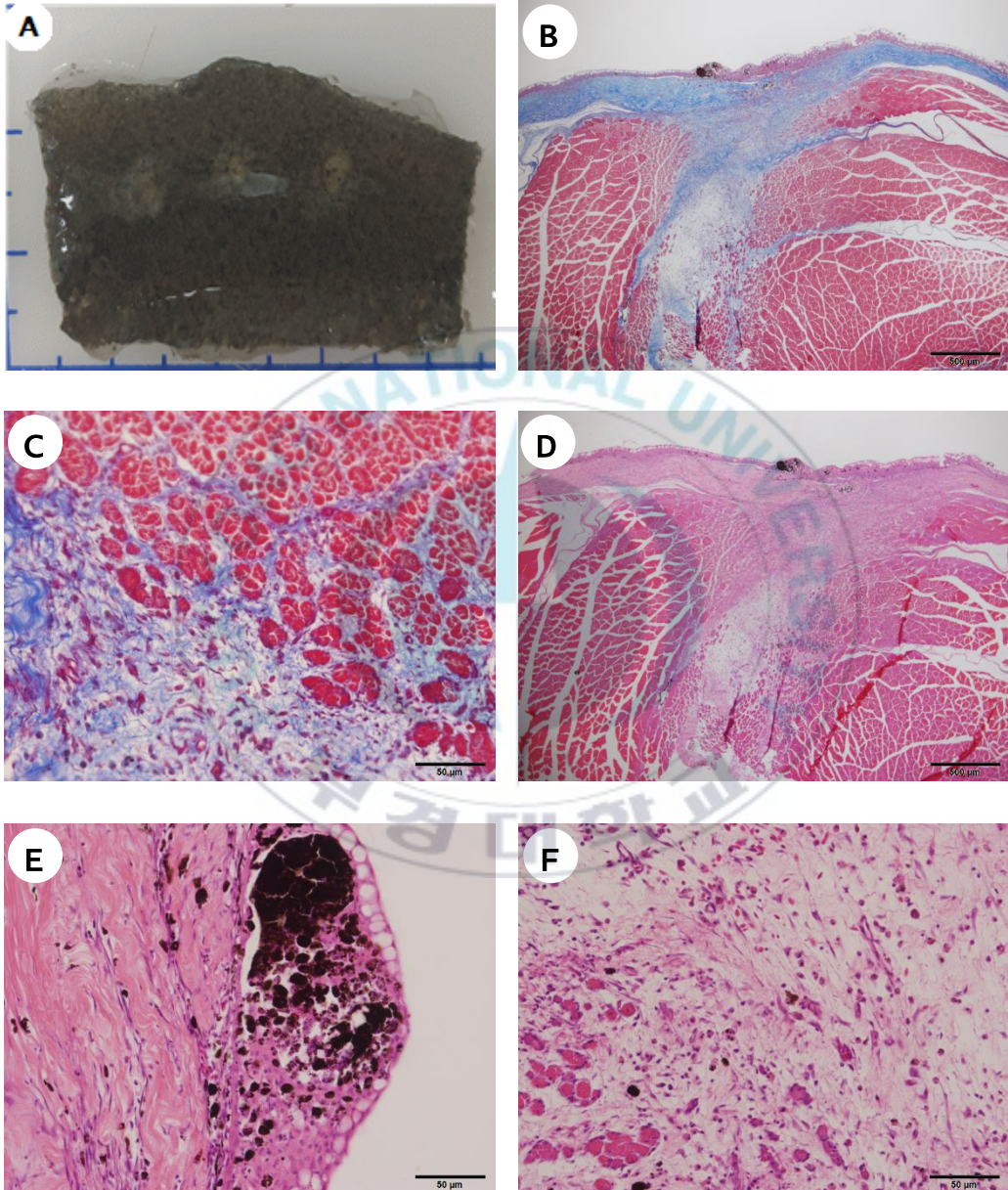


Figure 18. At 7days post wounding. (A) Photographs of wound healing at 7days after injury. (B) Masson' s trichrome staining of longitudinal section(x40) : dermis is not completely divided. (C) Hematoxylin and eosin (H&E) staining of longitudinal sections(x40). (D-G) H&E stain(x400), (D) re-epithelialization, (E)

skeletal muscle necrosis and exudate(fibrinous), (F) Exudate(purulent), (G) neovascularization, skeletal muscle regeneration, fibroblast.



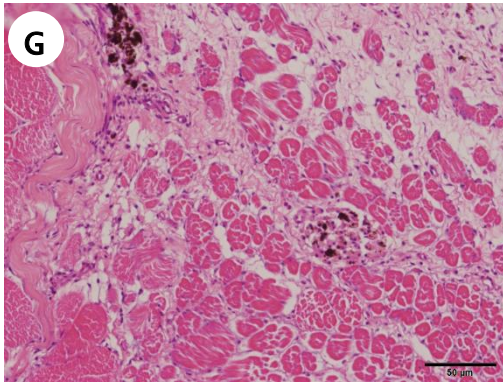
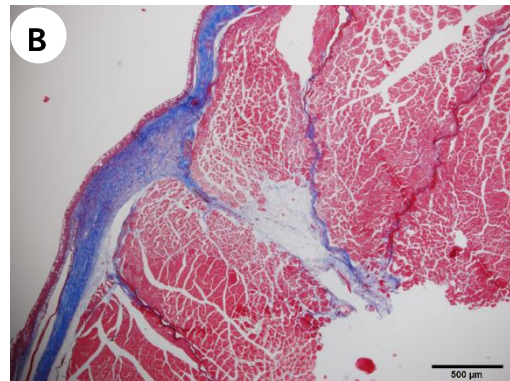
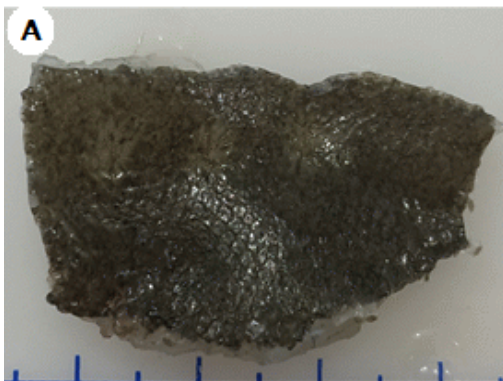
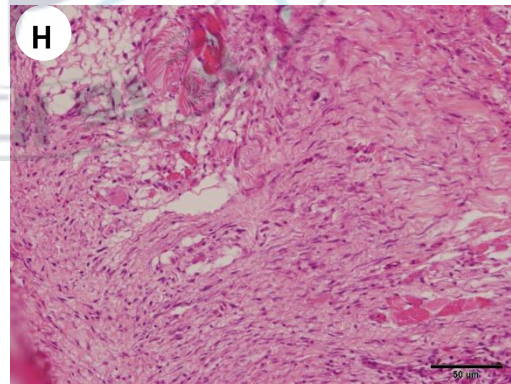
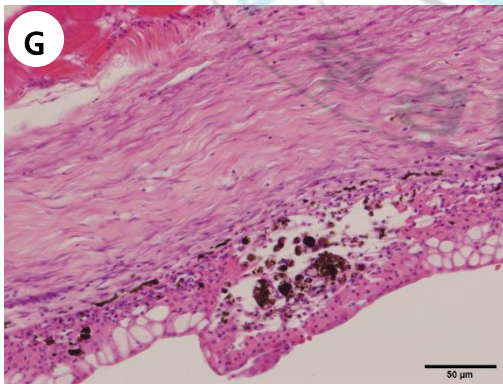
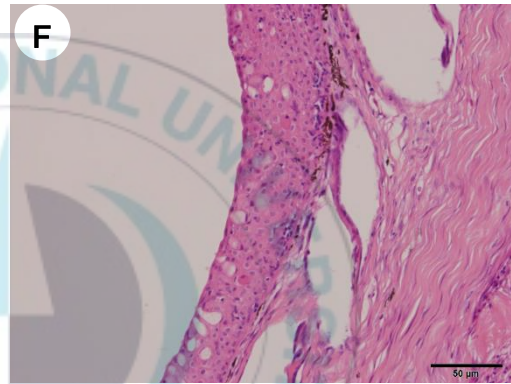
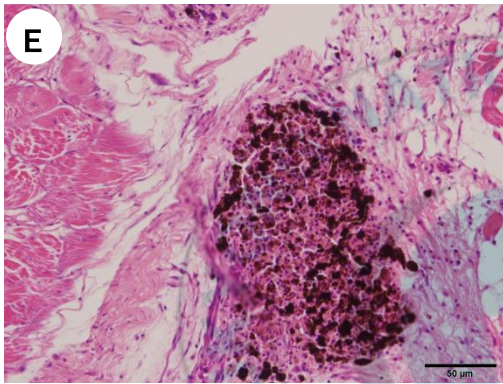
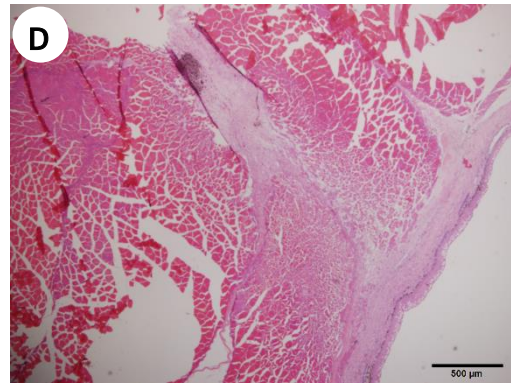
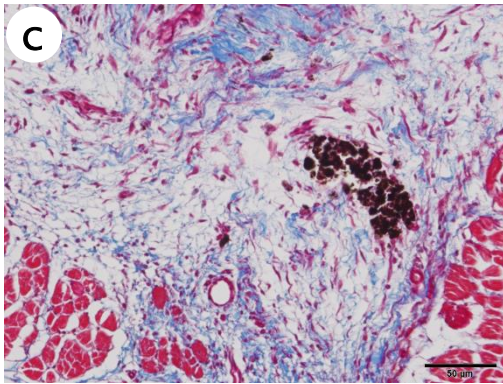


Figure 19. At 14days post wounding. (A) Photographs of wound healing at 14days after injury. (B–C) Masson' s trichrome staining of longitudinal section (B, x40) and new connective tissue (C, x400). (D) Hematoxylin and eosin (H&E) staining of longitudinal sections(x40). (E–G) H&E stain(x400), (E) MMC in epithelial, (F) granulation tissue. (G) skeletal muscle regeneration.





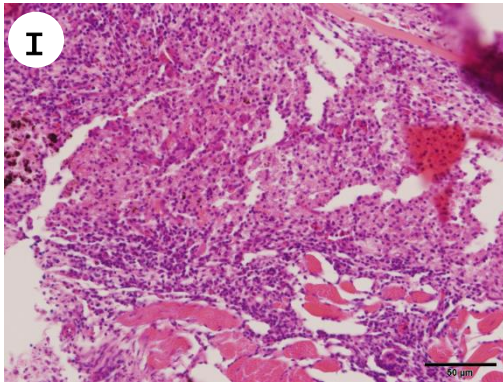


Figure 20. At 21days post wounding. (A) Photographs of wound healing at 21days after injury. (B–C) Masson' s trichrome staining of longitudinal section (B, x40) and new connective tissue (C, x400). (D) Hematoxylin and eosin (H&E) staining of longitudinal sections (x40). (E–I) H&E stain (x400), (E) MMC below the centre of the wound. (F) Scale pocket formation, (G) MMC in epithelial, (H) Connective tissue, (I) Inflammation.

감사의 글

어패류 병리학 실험실에 들어온 지 엇그제 같은데 벌써 2 년 6 개월의 시간이 흘러 석사과정을 마무리 짓게 되었습니다. 최선을 다하지 못한 아쉬움이 가득하고 너무나 부족하지만 이러한 저에게 많은 도움을 주신 고마운 분들께 감사의 마음을 전하고 싶습니다.

오늘날의 졸업까지 항상 따뜻한 응원을 아끼지 않으신 허민도교수님, 항상 부족함이 많은 저를 지도 해주셔서 감사합니다. 바쁘신 와중에도 소중한 시간을 내어 논문심사 해주시고 따뜻한 격려와 조언을 아끼시지 않은 정현도교수님, 정준기교수님께 깊은 감사를 드립니다. 6 년간의 대학과정동안 많은 것을 가르쳐 주신 김기홍 교수님, 김도형 교수님, 강주찬 교수님께도 이 자리를 빌어서 감사의 마음을 전합니다.

바쁜 과제에도 불구하고 실험적 조언과 지도를 해주신 이무근 선배님, 지금은 너무 멀리 가버린 경식 선배에게도 고마운 마음을 전합니다. 또한 실험실에 들어 왔을 때부터 너무 많은 것을 알려주시고 이끌어 주신 보성 선배, 감사한 일이 너무 많아서 다 쓰지 못하네요. 실험실에 있으며 가장 자주 그리고 가장 오래 마주치며 부족한 후배한테 많은 걸 알려주신다고 고생 많으셨습니다. 정말 모든 일이 다 감사합니다.

넵치를 구하는데 큰 도움을 주신 원홍수산 사장님과 우주 선배 정말 감사드립니다. 덕분에 실험을 진행할 수 있었습니다.

그리고 실험실 생활을 하면서 알게 된 우주 선배, 준규 선배, 수연 언니, 실험 조언도 얻고 힘들 때 도움이 많이 되었습니다. 덕분에 재미있는 대학원 생활을 보낼 수 있었습니다. 감사합니다.

동갑내기 친구 효은이, 우리방 막내 노을이, TLO 준용오빠, 연구원 다혜, 함께 많은 추억을 쌓은 약리방 현호, 승현이, 주안 오빠 그리고 늦은 시간까지 실험하면 항상 보였던 준우, 지연이 모두 옆에서 응원 해줘서 고마웠습니다.

대학원 진학한다고 하여 걱정이 많았던 아버지와 어머니 항상 저를 믿어 주시고 응원해 주셔서 감사합니다.

끝으로 졸업하기에 부족한 점이 많은 저를 도와주신 모든 분들께 다시 한 번 감사의 마음을 전하며 이렇게 받은 도움을 베풀 수 있는 사람이 되도록 앞으로 노력해 나아가겠습니다. 감사합니다.

참고문헌

- Akbik, D., M. Ghadiri, W. Chrzanowski, and R. Rohanizadeh. 2014. Curcumin as a wound healing agent. *Life sciences* 116 (1):1–7.
- Bernet, D, H Schmidt, W Meier, P Burkhardt-Holm, and T Wahli. 1999. 'Histopathology in fish: proposal for a protocol to assess aquatic pollution', *Journal of fish diseases*, 22: 25–34.
- Bilton, H., and G. Robins. 1973. The effects of starvation and subsequent feeding on survival and growth of Fulton channel sockeye salmon fry (*Oncorhynchus nerka*). *Journal of the Fisheries Board of Canada* 30 (1):1–5.
- Caballero, M., A. Obach, G. Rosenlund, D. Montero, M. Gisvold, and M. Izquierdo. 2002. Impact of different dietary lipid sources on growth, lipid digestibility, tissue fatty acid composition and histology of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture* 214 (1–4):253–271.
- Caraceni, Paolo, Bruno Nardo, Marco Domenicali, Paola Turi, Manuela Vici, Mara Simoncini, Nicola De Maria, Franco Trevisani, David H Van Thiel, and Massimo Derenzini. 1999. 'Ischemia-reperfusion injury in rat fatty liver: role of nutritional status', *Hepatology*, 29: 1139–46.
- Chao, J., T.–I. Huo, H.–Y. Cheng, J.–C. Tsai, J.–W. Liao, M.–S. Lee, X.–M. Qin, M.–T. Hsieh, L.–H. Pao, and W.–H. Peng. 2014. Gallic acid ameliorated impaired glucose and lipid homeostasis in high fat diet–induced NAFLD mice. *PloS one* 9 (6):e96969.
- Fontagne, S., I. Geurden, A.–M. Escaffre, and P. Bergot. 1998. Histological changes induced by dietary phospholipids in intestine and liver of common carp (*Cyprinus carpio* L.) larvae. *Aquaculture* 161 (1–4):213–223.
- Fontenot, Deidre K, and Donald L Neiffer. 2004. 'Wound management in teleost fish: biology of the healing process, evaluation, and treatment', *Veterinary Clinics: Exotic Animal Practice*, 7: 57–86.
- Ijaz, Samia, Wenxuan Yang, Marc C Winslet, and Alexander M Seifalian. 2003. 'Impairment of hepatic microcirculation in fatty liver', *Microcirculation*, 10: 447–56.

- Jensen, Linda B, Thomas Wahli, Charles McGurk, Tommy Berger Eriksen, Alex Obach, Rune Waagbø, Ana Handler, and Carolina Tafalla. 2015. 'Effect of temperature and diet on wound healing in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.)', *Fish physiology and biochemistry*, 41: 1527–43.
- Karlsen, C., E. Ytteborg, G. Timmerhaus, V. Høst, S. Handeland, S. M. Jørgensen, and A. Krasnov. 2018. Atlantic salmon skin barrier functions gradually enhance after seawater transfer. *Scientific reports* 8 (1):9510.
- Kavalukas, S. L., and A. Barbul. 2011. 'Nutrition and wound healing: an update', *Plast Reconstr Surg*, 127 Suppl 1: 38S–43S.
- Kumar, V, RS Cotran, and SL Robbins. 2004. "Robbin's basic pathology (pp. 641 – 655)." In: Philadelphia: Saunders: An Imprint of Elsevier.
- Kumari, Usha, Neeraj Verma, Ashwini Kumar Nigam, Swati Mittal, and Ajay Kumar Mittal. 2017. 'Wound-healing potential of curcumin in the carp, *Labeo rohita*', *Aquaculture research*, 48: 2411–27.
- Marchesini, Giulio, Elisabetta Bugianesi, Gabriele Forlani, Fernanda Cerrelli, Marco Lenzi, Rita Manini, Stefania Natale, Ester Vanni, Nicola Villanova, and Nazario Melchionda. 2003. 'Nonalcoholic fatty liver, steatohepatitis, and the metabolic syndrome', *Hepatology*, 37: 917–23.
- McCuskey, Robert S, Yoshiya Ito, Graham R Robertson, Margaret K McCuskey, Michael Perry, and Geoffrey C Farrell. 2004. 'Hepatic microvascular dysfunction during evolution of dietary steatohepatitis in mice', *Hepatology*, 40: 386–93.
- Nakamura, A., and Y. Terauchi. 2013. Lessons from mouse models of high-fat diet-induced NAFLD. *International journal of molecular sciences* 14 (11):21240–21257.
- Oka, Takehiko, Yuhei Nishimura, Liqing Zang, Minoru Hirano, Yasuhito Shimada, Zhipeng Wang, Noriko Umemoto, Junya Kuroyanagi, Norihiro Nishimura, and Toshio Tanaka. 2010. 'Diet-induced obesity in zebrafish shares common pathophysiological pathways with mammalian obesity', *BMC physiology*, 10: 21.
- Polakof, Sergio, Stéphane Panserat, José L Soengas, and Thomas W Moon.

2012. 'Glucose metabolism in fish: a review', *Journal of Comparative Physiology B*, 182: 1015–45.
- Quilhac, Alexandra, and Jean-Yves Sire. 1999. 'Spreading, proliferation, and differentiation of the epidermis after wounding a cichlid fish, *Hemichromis bimaculatus*', *The Anatomical Record: An Official Publication of the American Association of Anatomists*, 254: 435–51.
- Richardson, Rebecca, Krasimir Slanchev, Christopher Kraus, Philipp Knyphausen, Sabine Eming, and Matthias Hammerschmidt. 2013. 'Adult zebrafish as a model system for cutaneous wound–healing research', *Journal of Investigative Dermatology*, 133: 1655–65.
- Rahu A. Nathwani, Shireen Pais, Telfer B. Reynolds, and Neil Kaplowitz. 2005. 'Serum Alanine Aminotransferase in Skeletal Muscle Diseases', *Hepatology*, 41:380–382.
- Roberts, R. J. 2012. *Fish pathology*: John Wiley & Sons.
- Roubal, F., and A. Bullock. 1988. The mechanism of wound repair in the skin of juvenile Atlantic salmon, *Salmo salar* L., following hydrocortisone implantation. *Journal of fish biology* 32 (4):545–555.
- Segner, H., and J. V. Juario. 1986. Histological observations on the rearing of milkfish, *Chanos chanos*, fry using different diets. *Journal of Applied Ichthyology* 2 (4):162–172.
- Sheth, K., and P. Bankey. 2001. The liver as an immune organ. *Current opinion in critical care* 7 (2):99–104.
- Takashima, F., and T. Hibiya. 1995. An atlas of fish histology: normal and pathological features.
- Tipoe, G. L., C. Ho, E. C. Liong, T.–M. Leung, T. Y. Lau, M.–L. Fung, and A. A. Nanji. 2009. Voluntary oral feeding of rats not requiring a very high fat diet is a clinically relevant animal model of non–alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Histology and histopathology*.
- Watanabe, S., R. Yaginuma, K. Ikejima, and A. Miyazaki. 2008. 'Liver diseases and metabolic syndrome', *J Gastroenterol*, 43: 509–18.
- 김경剛, 최혜미, and 박상欄. 1995. '어유 섭취가 유도하는 간 비대와 퍼옥시좀 활성화

- 증가', 한국지질학회지 5권 2호 p.183-192.
- 김성삼, 오대한, 최세민, 김강웅, 김경덕, 이봉주, 한현섭, and 이경준. 2015. 사료 내 단백질과 지방 수준이 참돔 (*Pagrus major*) 치어의 성장, 사료효율 및 비특이적 면역력에 미치는 영향. *Korean J Fish Aquat Sci* 48 (3):308-313.
- 심재준. 2018. Secondary Causes of Fatty Liver. *Toward a Better Understanding of Non-alcoholic Fatty Liver Disease in 2018*.
- 오대한, 김민기, 윤관식, and 이경준. 2019. 넙치 (*Paralichthys olivaceus*) 사료 내 어유 (Fish oil) 대체원으로써의 diacylglycerol 이용성 평가. *한국수산과학회지* 52 (4):366-373.
- 이무근. 2008. '양식 송어 녹간증에 대한 병리학적 연구', 학위논문.
- 정문진, and 문명진. 1998. '무당개구리 (*Bombina orientalis*) 진피 상처치유반응의 형태적 분석', *한국현미경학회지*, 28: 379-90.
- 최혜승, 박승렬, and 정춘구. 2002. 저수온기 돔류의 녹간증 혈청성분. *한국어병학회지* 15 (1):43-48.
- 최혜승, 허민도, 이무근, 최희정, and 박명애. 2011. 저수온기 양식 조피볼락, *Sebastes schlegeli* 간에 대한 조직병리학적 연구. *한국어병학회지* 24 (3):225-236.
- 황세명. 2015. '인위 유도 조피볼락(*Sebastes schlegeli*) 식이성 간장증 예어 대한 *Streptococcus iniae* 공격', 학위논문.