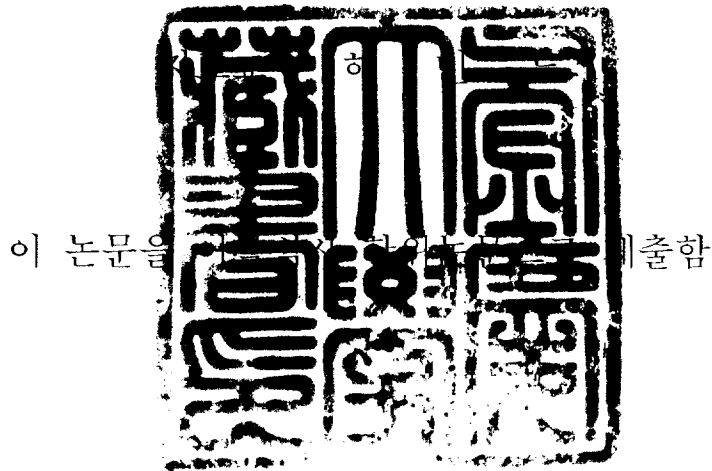


이학석사 학위논문

나일틸라피아(*Oreochromis niloticus*)의
실험적 빈혈과 회복에 관한 병리학적
연구



2005년 2월

부경대학교 대학원

어 병 학 과

송 나 영

송나영의 이학석사 학위논문을 인준함

2005년 2월 25일

주 심 이학박사 강 주 찬



위 원 이학박사 김 기 홍



위 원 농학박사 허 민 도



목 차

Abstract	i
I. 서론	1
II. 재료 및 방법	4
1. 실험어의 선택 및 유지 방법	4
2. 임상 소견 관찰	4
3. 빈혈의 유도 및 회복 기간 설정	4
4. 혈액학적 조사	5
(1) 채혈	5
(2) 혈액 생화학 파라메타 측정	5
(3) 적혈구 수, hematocrit, hemoglobin 양 측정	5
(4) 적혈구 지수	6
(5) 혈액 도말 표본 조사	6
5. 병리조직학적 조사	6
6. 유의성 검정	7
III. 결과	7
1. 임상 및 육안적 소견	9
2. 혈액학적 소견	9
(1) 혈액 생화학적 파라메타의 변화	9
(2) 말초혈액 Hematocrit(Ht) 및, Hemoglobin(Hb)치의 변화	9
(3) 적혈구 지수	10
(4) 적혈구 형태 변화	10
3. 병리조직학적 소견	14
IV. 고찰	16
V. 요약	24
VI. 결과그림 및 그림설명	25
VII. 감사의 글	33
VIII. 참고 문헌	34

**Pathological study on experimental anemia and recovery in Nile tilapia,
Oreochromis niloticus.**

Na Young Song

*Department of Fish Pathology, Graduate School
Pukyong National University*

Abstract

This study was conducted to know the differences in pathological characteristics between artificially induced hemorrhagic anemia(EHA) and hemolytic anemia(ELA) during the anemic and recovery course, using Nile tilapia(*Oreochromis niloticus*). EHA were induced by 4 bleedings with a volume of about 1% of body weight through caudal vein at an interval of 3 days. ELA were induced by intraperitoneal injections of 0.05ml of 1% phenylhydrazine/100g of body weight for 2 times at an interval of 7 days. On the 12th day, hematocrits(Ht) decreased to around 10% and hemoglobin contents(Hb) reduced to around 3g/dℓ in both anemia. A period of 16 to 49th day was arbitrarily taken as a recovery phase. There were no clinical signs and gross findings except for pale gills during the anemic state of both. On the 16th day, total serum protein decreased to 2.2g/dℓ and nearly not recovered until 38th day in EHA. Immature erythrocytes started appearing on the 8th day and characteristic erythrocytes with cytoplasm weakly stained

on the 12th day in both, which were still noted on the 49th day in EHA. In liver, fatty degeneration around central vein 12~38th day in EHA and hyaline degeneration around central vein 12~26th day in ELA were found. In head kidney, increased hemopoiesis was observed from the 12th day in EHA and from the 4th day in ELA, and macrophages engulfing erythrocytes were observed from the 16th day in EHA and from the 2nd days in ELA. In spleen, activated ellipsoids from the 12th day in EHA, and from the 2nd day in ELA. In ELA, severe accumulation of hemosiderin in both spleen and head kidney were constantly noted from the 2~49th day. In conclusion, EHA and ELA were normocytic hypochromic and macrocytic normochromic in type respectively, although both were normocytic hypochromic during the recovery phase. Hb was more slowly recovered than Ht in both. Both kinds of liver degeneration were completely recovered on the 49th day in both, although they remained for a long time in EHA.

Key words: anemia · recovery · phenylhydrazine · Nile tilapia · *Oreochromis niloticus*

I. 서 론

빈혈 (anemia)이란 말초 혈액 내에 순환하고 있는 적혈구 부피의 감소 또는 헤모글로빈량의 감소, 또는 그 양자가 해당하는 경우를 말하며, 빈혈의 결과 조직이나 장기에 공급되는 산소의 부족을 초래할 수 있음을 의미한다. 순환하는 적혈구의 부피를 직접적으로 계산할 수 없기 때문에 hematocrit 수치와 hemoglobin 농도로 빈혈을 판단한다. 어류에서는 일반적으로 아가미가 창백하고 혈액이 묽으며, hematocrit 수치가 낮으면 빈혈이라고 판단한다.

어류에서도 고등포유류에서와 같이 빈혈을 원인, 병태생리학적 기원 또는 적혈구 패턴 변화에 따라 분류한다. 그 중에서 병태생리학적 기원에 따라 출혈성 (hemorrhagic), 용혈성 (hemolytic), 재생불량성 (hypoplastic)으로 주로 분류하는 것이 빈혈의 병리학적 영향을 평가하는데 유용하다 (Roberts, 2001).

어류에서 빈혈은 각종 질병에 동반되는 비특이적 소견이다. 참돔의 이리도 바이러스병, 차넬메기의 바이러스병 그리고 능성어의 바이러스병 또는 연어과 어류에서 주로 발생하는 전염성 췌장 괴사병 (Infectious Pancreatic Necrosis, IPN) 및 무지개 송어에서 발생하는 출혈성 바이러스 패혈증 (VHS)과 해수 양식은 연어에서 발생하는 적혈구 봉입체 증후군 (EIBS) 등 바이러스 질병에서 확인된다. 또 에드워드 병, *Vibrio anguillarum*이 원인체인 비브리오병 및 *Flavobacterium columnare*에 의한 발생하는 담수어 아가미 부식병, 그리고 송어나 연어류에 발생하는 절창병 (furunculosis)과 같은 세균성 질병과 무지개 송어나

방어에서 발생하는 익티오포누스병 및 담수어류의 *Branchiomyces*병과 같은 진균병에서도 확인된다. 그리고 조피볼락의 *Marocotyle sebastis*, 방어(*Heteraxine heterocerca*), 참돔의 *Bivagina tai* 및 복어의 *Heterobothrium tetrodonis* 감염에서도 빈혈 소견을 보인다.

빈혈의 병리학적 영향에 관한 실험적 연구는 포유류에서 많이 이루어져 있다. 실험적 빈혈에 대한 영향을 평가하기 위하여 채혈 또는 phenylhydrazine과 같은 용혈성 물질 주사를 통하여 빈혈을 인위적으로 유도하기도 한다. 그리고 철 결핍 사료의 공급, 신장 자극 또는 종양 형성 등의 방법도 사용하였다 (Datta *et al.*, 1989; McCormack *et al.*, 1990; Wierenga and Konings, 1990; Koong and Hirst, 1991; Mayani *et al.*, 1991; Redondo *et al.*, 1995). 포유류에서는 빈혈시 피부는 창백해지고, 상피와 진피는 위축되어 얇아져 탄력성이 없어진다. 특히 손톱과 발톱이 부서지기 쉬우며, 그 불룩한 형태를 유지하기 어렵게 된다. 간장 및 신세뇨관의 상피와 심장의 심근세포에서 지방변성 또는 경색괴사가 관찰되는 것으로 알려져 있다 (Kumar *et al.*, 2005).

어류에서 빈혈에 대한 연구에는 반복 채혈을 통한 인위적 무지개 송어 빈혈에 관한 실험 (Kawatsu, 1968), Monogenean 감염에 따른 넙치의 빈혈과 회복에 대한 연구 (Yoshinaga *et al.*, 2001) 및 phenylhydrazine을 주사를 통한 연어과 어류 (Smith *et al.*, 1970)와 금붕어 (Houston *et al.*; Kawatsu, 1971)에서 용혈성 빈혈 실험의 예가 있다.

Icefish (*Chaenocephalus aceratus*)는 혈색소가 없는 혈액의 산소 운반 능력이 해수의 산소 운반 능력과 같고 가스 운반을 전적으로 혈장에 의존한다는 보고가 있다 (Ruud, 1954). 또 hemoglobin을 가지지 않은 뱀장어를 사용한 실험에서 정상 뱀장어보다 더 많은 혈액이 심장에서부터 박출된다고 알려져 있다 (Steen & Berg, 1966). 그리고 무지개 송어의 Ht치를 70%까지 감소시킨 실험에서 심장 박출량이 증가함으로써 산소를 조직 내에 정상적으로 공급한다는 보고도 있다 (Cameron & Davis, 1970).

어류의 빈혈에 대한 연구에서 빈혈 유형에 대한 언급은 있지만, 숙주에 대한 빈혈의 임상적 및 병리조직학적 영향에 대하여 잘 알려져 있지 않다. 그러나 어류 혈액의 산소운반능 차이, 빈혈에 따른 보상기전의 차이 등에 근거하여, 고등 동물과는 그 영향에 차이가 있을 것으로 사료된다.

따라서 본 연구는 어류의 각종 질병에 주로 동반되는 출혈성 및 용혈성 빈혈을 나일틸라피아에 실험적으로 유도하여, 빈혈의 지속 및 회복 과정에서 일어나는 병리학적 특성 및 차이를 알아보고자 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 실험어의 선택 및 유지 방법

부경대학교 부속 양어장에서 양식되고 있는, 임상적으로 건강하고 체중이 65~120g인 Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*)를 분양 받아, 실험실 내 순환여과식 수조에 수용하여, 실험 전 1 주일 동안 순치 기간을 두었다. 이 중 4개체는 대조구, 28개체는 출혈성 빈혈 유도군, 30개체는 용혈성 빈혈 유도군으로 하였다. 실험기간 동안 사육수의 수온은 25~28℃, 용존 산소는 7~8ppm, pH는 6.5~7.0이었으며 사료는 급여하지 않았다.

2. 임상 소견 관찰

실험 기간 동안, 실험어의 외관과 행동학적 변화 유무를 오전오후 각 1회씩 육안적 관찰을 수행하였다.

3. 빈혈의 유도 및 회복 기간 설정

출혈성 및 용혈성 빈혈의 경우 모두, 빈혈의 유도 및 지속기간을 2주 동안으로 하였으며, 유도 시작 후 2주째에 hematocrit치가 약 10%에 이르도록 하였다. 빈혈 유도 시 실험어를 벤조카인 (Benzocaine, Sigma, USA)에 가볍게 마취한 후 물수건 위에 보정한 후 조심스럽게 조작하였다.

출혈성 빈혈은 14일 동안 체중의 약 1%에 해당하는 혈액을, 미부 혈관 (caudal vessel)으로부터, 총 4회에 걸쳐, 반복 채혈함으로써 유도하였다. 한편, 용혈성 빈혈은 phenylhydrazine (Acros, USA)을 0.9% NaCl에 희석한 0.1% phenylhydrazine을, 체중 100g 당 0.05ml를 가슴지느러미 기부를 통해 복강에

주사하고, 다시 7일 경과 후 동량을 동일 경로로 반복 주사함으로써 유도하였다. 회복 기간을 16일째부터 49일째까지로 간주하여 지속적으로 관찰하였다.

4. 혈액학적 조사

(1) 채혈 방법

채혈은 출혈성 빈혈 유도과 혈액학적 검사를 위하여 이루어졌다. 채혈은 출혈성 빈혈 유도군 및 용혈성 빈혈 유도군 모두, 총 10 회에 걸쳐 이루어졌다. 실험어를 벤조카인으로 마취하여 불수건 위에 눕혀 보정한 다음, 헤파린 처리 주사기를 사용하여, 미부 혈관 (caudal vessel)으로부터 신속히 채혈하였다. 채혈에 따른 채혈 및 부검 개체수를 Table 1에 정리하였다.

(2) 혈액 생화학 파라메타 측정

채혈한 혈액을 4℃에서 하루 동안 방치한 후, 3,000rpm에서 5분간 원심분리하여 TP (total protein), ALP (alanine transaminase) 및 AST (aspartate transaminase)치를 측정하였다. 바로 측정하지 못할 경우, -70℃ deep freezer에 보관하면서 분석하였다.

(3) 적혈구 수, hematocrit (Ht), hemoglobin (Hb)치 측정

적혈구 수는 혈액을 pH 7.4 PBS (phosphate buffer solution)로 1:800배 희석한 후, hemocytometer (Improved Neubauer, Germany)를 이용하여 광학현미경 하에서 계수하였다. Ht는 헤파린 처리된 capillary tube로 혈액을 흡입한 후, 한 쪽 끝을 봉하여 microhematocrit centrifuge (01501, Hawksley & Sons, England)에서 12,000rpm, 5분간 원심 침전시켜 microhematocrit reader

(Hawksley Reader, Hawksley & Sons, England)로 측정하였다. Hb는 임상용 Kit (Asan, Korea)를 사용하여 Cyanmethemoglobin 법으로 측정하였다.

(4) 적혈구 지수

채혈한 혈액으로 측정한 적혈구 수, hematocrit (Ht) 및 hemoglobin (Hb)양을 근거하여 적혈구 지수인 평균적혈구혈색소농도 (mean corpuscular hemoglobin concentration, MCHC), 평균적혈구용적 (mean corpuscular volume, MCV) 및 평균적혈구헤모글로빈 (mean corpuscular hemoglobin, MCH)을 아래의 계산식에 의하여 구하였다.

$$MCHC (\%) = \frac{Hb (g/100ml)}{Ht (\%)} \times 100$$

$$MCV (\mu m^3) = \frac{Ht (\%)}{RBC (\times 10^6 / cell mm^3)} \times 10$$

$$MCH (pg) = \frac{Hb (g/100ml)}{RBC (\times 10^6 / cell mm^3)} \times 10$$

(5) 혈액 도말표본 조사

미부 혈관으로부터 채혈한 혈액을 혈액슬라이드에 도말하여 Diff-Quik 염색을 한 후, 혈구 세포의 이상 유무 및 내용을 광학현미경으로 관찰하였다.

5. 병리조직학적 조사

실험어를 벤조카인에 마취한 후 부검하였다. 부검 날짜와 부검 개체 수는

Table 1에 나타내었다. 복강을 열고, 내부 장기를 육안적으로 세밀히 관찰한 후 전 장기를 Bouin액에 1차 고정하였다. 1차 고정 후 24시간 후에 조직을 세절하여 동일 고정액에 2차 고정하였다. 24시간 동안 2차 고정 후, 조직을 수도 수에 수세하고 70%에서 100%까지 순차 농도 알코올로 탈수하였다. Xylene 투명화를 거친 후 파라핀 진화를 시키고, 파라핀 포매 후 microtome (Reichert-Jung 820, Leica)을 사용하여 4 μ m두께의 박편을 얻었다. 그리고 H&E 염색하여 광학현미경으로 관찰하였다. 각 조직을 Prussian blue reaction을 하여 hemosiderin 축적 유무를 관찰하였다.

6. 유의성 검정

수치결과의 통계적 처리는 SPSS 통계 프로그램 (SPSS Inc., USA)을 이용하여 ANOVA test를 실시하였다. 그리고 사후 다중비교는 T-test로 실험군과 대조군 평균 간의 유의성을 검정하였다 ($P < 0.05$).

Table 1. Numbers of blood-sampled and necropsied fish in respective haemorrhagic and hemolytic anemia-inducing groups

Day	Hemorrhagic anemia inducing group		Hemolytic anemia-inducing group	
	Blood sampled	Necropsied	Blood sampled	Necropsied
Control	15	4	15	4
2	4	4	3	3
4	22	3	3	3
8	16	3	3	3
12	18	3	3	3
16	3	3	3	3
20	3	3	4	4
26	3	3	4	4
38	3	3	4	4
49	3	3	3	3

III. 결 과

1. 임상 및 육안적 소견

빈혈 및 회복 기간 동안 아가미의 빈혈성 퇴색 이외에 특기할 임상 소견은 관찰되지 않았다.

2. 혈액학적 소견

(1) 혈액 생화학적 파라메타의 변화

인위적 빈혈 유도 직전의 어군인 대조군 15마리의 틸라피아로부터 측정된 총 단백질(TP), ALT, AST의 평균은 각각 3.4g/dℓ, 3.8u/ℓ, 30.0u/ℓ로 나타났다. 출혈성 빈혈의 경우에는 채혈에 의한 빈혈 유도 기간 중 12일째에 혈장 총단백량이 2.5g/dℓ으로 감소하여 회복 기간인 20일째에 2.0g/dℓ까지 감소한 후, 49일째에 2.7g/dℓ으로 다소 증가하였다. 용혈성 빈혈의 경우에는 빈혈 유도 기간 및 회복 기간 동안 혈액 생화학적 파라메타에 유의한 변화가 관찰되지 않았다 (Table 2).

(2) 말초혈액 Hematocrit(Ht) 및, Hemoglobin(Hb)치의 변화

빈혈 유도 직전의 대조군의 평균 Ht는 32%이었고, 평균 Hb는 9.17g/dℓ이었다. 출혈성 빈혈의 경우에는 반복적인 채혈에 기인하여, 12일째에 4회 채혈 후 Ht가 평균 12%까지 감소하였고, Hb는 3.16g/dℓ이었다(Table 3). 용혈성 빈혈의 경우에는 12일째에 phenylhydrazine 2회 주사 후 평균 Ht 치가 11%이었고, 평균 Hb는 2.55g/dℓ로 낮아졌다 (Table 4). 이들 수치는 회복 기간 동안

다시 증가하여, 49일째에 출혈성 빈혈의 경우, Ht치와 Hb양이 각각 28%, 4.89g/dl이었고 (Table 3), 용혈성 빈혈의 경우에는 각각 31%, 5.81g/dl이었다 (Table 4).

(3) 적혈구 지수

빈혈 유도 직전의 대조군의 MCHC, MCV 및 MCH는 각각 29.1%, $86.8\mu\text{m}^3$, 25.4pg이었다. 출혈성 빈혈의 경우에는 유도 12일째에 MCHC가 18.7%로 감소하였고 49일째에 17.2%로 여전히 낮은 수치였으며, MCV와 MCH는 시기에 따라 유의한 변화가 있었으나, 지속성의 일정한 변화는 관찰되지 않았다 (Table 3). 용혈성 빈혈의 경우에는 빈혈 유도 기간에는 MCHC가 대조군(29.1%)과 차이 있는 변화가 없었고, 회복 16일째에 15.9%로 감소하여 49일째에 대조군(29.1%)보다 낮은 19.2%였다. MCV는 유도 2일째에 대조 ($86.8\mu\text{m}^3$)보다 $429.1\mu\text{m}^3$ 로 증가하였고, 49일째에는 다시 낮아져 $148.3\mu\text{m}^3$ 이었다. 그리고 MCH는 유도 4일째 128.9pg이었으나 회복 기간 동안에는 큰 변화가 없었다 (Table 4).

(4) 적혈구 형태 변화

빈혈 유도 직전의 대조군 혈액 내 적혈구는 대부분, 세포질이 호산성이고 중앙에 핵을 가진 타원형의 성숙 적혈구와 세포의 형태는 성숙 적혈구와 같은 타원형이나 크기는 크며 성숙 적혈구보다 세포질이 옅은 호산성을 띠는 미성숙 적혈구들로 구성되어 있었다 (Fig 1-1).

출혈성 빈혈의 경우에는 유도 8일째에 호염성 유약 적혈구와 분엽 형태를

가진 적혈구들이 출현하였다 (Fig 2-1). 그리고 12일째에는 세포질 염색성이 없는 적혈구들이 대량 출현하였다 (Fig 3-1). 49일째에도 세포질 염색성이 없는 적혈구들이 관찰되었다.

한편, 용혈성 빈혈의 경우에는 phenylhydrazine(PH) 주사 후 2일째에 핵이 농축되거나, 사라진 적혈구와 세포질의 헤모글로빈이 고르게 분포하지 않고 비어있는 곳을 가진 성숙 적혈구들이 다수 관찰되었으며, 세포의 구조가 붕괴되고 그 붕괴 잔존물들이 관찰되었다 (Fig 1-2). 이들 이상 세포들은 PH 주사 후 8일째까지 관찰되었으며, 8일째부터 세포가 원형이고 세포질이 호염성인 미성숙 적혈구들이 다수 관찰되었다 (Fig 2-2). PH 주사 후 12일째에는 대부분 미성숙 적혈구와 비정상적인 염색성을 보이는 이상 적혈구들로 구성되어 있었다(Fig 3-2). 20일째에는 염색성 이상 적혈구는 거의 관찰되지 않고, 대부분이 성숙 적혈구와 미성숙 적혈구로 구성되어 있었으며, 49일째에는 세포질이 호산성이고 타원형인 성숙 적혈구로 구성되어 있었다.

Table 2. Changes of blood total protein(TP), alanine transaminase(ALT), aspartate transaminase (AST) blood chemistry in experimental anemia groups

Day	Induced hemorrhagic anemia			Induced hemolytic anemia		
	TP (g/dℓ)	ALT (μ/ ℓ)	AST (μ/ ℓ)	TP (g/dℓ)	ALT (μ/ ℓ)	AST (μ/ ℓ)
Control	3.4±0.8	3.8±6.1	30.0±19.6			
2	3.2±0.4	1.7±0.9	33.3±29.5	2.5±0.4	7.6±5.7	51.4±11.4
4	3.8±5.9	8.6±3.0	75.8±3.0	3.1±0.7	18.1±7.0*	65.0±28.6
8	2.7±0.4	8.1±3.7	135.0±59.0*	2.9±0.3	0.8±0.6	28.5±18.8
12	2.5±1.0	11.6±10.7*	41.4±5.1	2.7±0.7	1.7±2.1	25.3±23.5
16	2.3±0.3*	3.2±2.8	17.6±11.3	3.5±0.9	2.7±3.2	36.1±7.3
20	2.0±0.2*	1.4±0.9	29.3±11.8	2.9±0.4	1.5±0.8	52.8±28.3
26	2.0±0.8*	9.8±13.8	133.1±181.7	2.9±0.1	6.2±3.4	42.9±36.4
38	2.3±0.3*	12.2±5.3	48.4±28.4*	3.1±2.5	5.9±4.0	49.9±64.7
49	2.7±0.3	0.8±0.8	27.5±7.2	3.3±2.0	1.5±1.1	52.7±34.9

* significant difference from control (P<0.05).

Table 3. Changes of 6 kinds of hematological parameters in experimental hemorrhagic anemia

Day	Ht (%)	Hb (g/dl)	RBC count ($10^6/\text{mm}^3$)	MCHC (%)	MCV (μm^3)	MCH (pg)
Control	32 $\pm$ 4.1	9.17 $\pm$ 1.6	3.73 $\pm$ 0.7	29.1 $\pm$ 4.3	93.9 $\pm$ 13.6	25.4 $\pm$ 6.2
2	21 $\pm$ 3.0*	4.66 $\pm$ 1.0*	2.92 $\pm$ 0.9*	22.3 $\pm$ 2.3*	77.5 $\pm$ 31.1	17.0 $\pm$ 5.8*
4	21 $\pm$ 3.5*	6.07 $\pm$ 1.1*	2.58 $\pm$ 0.8	29.6 $\pm$ 2.5	83.8 $\pm$ 17.2	24.9 $\pm$ 6.1
8	19 $\pm$ 3.0*	4.25 $\pm$ 0.9*	1.95 $\pm$ 0.6*	22.6 $\pm$ 4.3*	101.1 $\pm$ 20.0*	22.6 $\pm$ 4.7
12	12 $\pm$ 5.7*	2.26 $\pm$ 1.5*	1.25 $\pm$ 0.5*	18.7 $\pm$ 4.1*	92.1 $\pm$ 7.6	17.2 $\pm$ 4.0
16	10 $\pm$ 2.1*	0.70 $\pm$ 0.3*	0.77 $\pm$ 0.3*	7.2 $\pm$ 2.9*	132.7 $\pm$ 24.0*	9.8 $\pm$ 5.1
20	12 $\pm$ 5.0*	2.16 $\pm$ 0.5*	1.47 $\pm$ 0.8*	18.6 $\pm$ 4.2*	90.5 $\pm$ 16.8	17.3 $\pm$ 6.8
26	13 $\pm$ 1.5*	4.14 $\pm$ 0.7*	1.15 $\pm$ 0.1*	31.0 $\pm$ 1.5	117.6 $\pm$ 21.1*	36.5 $\pm$ 7.7
38	22 $\pm$ 3.6*	5.94 $\pm$ 0.2*	2.69 $\pm$ 0.2*	25.6 $\pm$ 4.6	82.9 $\pm$ 20.3	22.8 $\pm$ 1.2
49	28 $\pm$ 1.5	4.89 $\pm$ 0.7*	3.74 $\pm$ 0.1	17.2 $\pm$ 1.7*	68.0 $\pm$ 15.3	11.7 $\pm$ 2.9

Ht: hematocrit, Hb: hemoglobin, MCHC: mean corpuscular hemoglobin concentration, MCV: mean corpuscular volume, MCH: mean corpuscular hemoglobin. n: number of fish analysed

* Statistical significance from control (P<0.05).

Table 4. Changes of 6 kinds of hematological parameters in experimental hemolytic anemia

Day	Ht (%)	Hb (g/dl)	RBC count ($10^6/\text{mm}^3$)	MCHC (%)	MCV (μm^3)	MCH (pg)
Control	32±4.1	9.17±1.6	3.73±0.7	29.1±4.3	93.9±13.6	25.4±6.2
2	13±7.4*	4.42±1.4*	0.30±0.2*	38.4±9.0	429.1±73.0*	165±48.1*
4	10±4.6*	3.36±1.6*	0.29±0.2*	33.3±9.0*	399.4±140.3*	128.9±32.4*
8	7±2.9*	1.80±0.5*	0.24±0.2*	25.7±4.9	392.6±215.0*	97.5±43.4*
12	11±1.2*	2.55±0.5*	0.67±0.1*	23.8±2.8	161.6±15.0	38.2±1.6
16	18±2.5*	2.89±0.2*	0.87±0.1*	15.9±1.1*	211.7±10.2*	33.5±2.3
20	19±1.5*	3.68±0.5*	1.25±0.4*	19.6±2.1*	159.8±46.9	30.9±7.5
26	22±2.8*	4.63±1.0*	1.16±0.3*	21.0±2.5*	199.7±56.4*	41.9±13.8
38	27±4.9*	5.79±1.3*	1.77±0.3*	21.3±1.6	152.8±14.3	32.7±5.6
49	31±4.9	5.81±0.5*	2.18±0.7*	19.2±1.4*	150.0±67.5	28.3±10.8

Ht: hematocrit, Hb: hemoglobin, MCHC: mean corpuscular hemoglobin concentration, MCV: mean corpuscular volume, MCH: mean corpuscular hemoglobin. n: number of fish analysed

* Statistical significance from control ($P<0.05$).

3. 병리조직학적 변화

출혈성 빈혈 유도군의 경우, 빈혈 유도 12일째부터 38일째까지 간장 중심정맥 중심성 (소엽구조가 분명하지 않으므로)의 지방변성 소견이 관찰되었다 (Fig 4-1). 12일째부터 비장 협조직(splenic ellipsoid)의 비후가 관찰되었다 (Fig 5-1). 두신에서는 16일째부터 적혈구를 탐식한 대식 세포들이 확인되었고 (Fig 6-1), 38일째까지 동 소견이 관찰되었다. 빈혈 유도 12일째부터 26일째까지 핵이 크고 짙은, 호염기성의 세포들이 많은 출현하는 조혈활성의 증가 소견이 관찰되었으며, 유사분열 중인 조혈세포도 다수 관찰되었다 (Fig 7-1).

용혈성 빈혈의 경우에는 PH 투여 12일째부터 26일째까지 간장의 중심정맥 중심으로 초자변성 소견이 확인되었다 (Fig 4-2). PH 주사 후 2일째부터 비장 협조직(ellipsoid)의 비후가 관찰되었고, 황갈색의 과립을 함유한 melano-macrophage center (MMC)들이 관찰되었다 (Fig 5-2). 또한, 두신에서는 적혈구를 탐식한 대식 세포들이 2일째부터 관찰되었으며 (Fig 6-2), 조혈활성 소견이 2일째부터 12일째까지 관찰되었다(Fig 7-2).

Hemosiderin의 축적 유무 및 내용을 확인하기 위한 조직에 대한 Prussian blue reaction 결과, 용혈성 빈혈에 모두에서 두신 및 비장 내 MMC내에서 강한 양성 반응을 관찰할 수 있었다 (Fig 8).

그러나, 간과 비장 및 두신 외의 다른 조직에서는 유의한 조직학적 변화가 관찰되지 않았다.

IV. 고찰

본 실험에서 출혈성 빈혈과 용혈성 빈혈을 유도하는 방법이 다르기 때문에 빈혈의 지속 및 회복 과정에서 일어나는 두 빈혈의 병리학적 특성 및 차이를 절대적으로 비교할 수는 없다. 그러나 그 외 실험적 조건을 동일하게 하여 그 특성을 알아보고자 하였다.

용혈성 빈혈 유도시 사용한 phenylhydrazine은 적혈구의 필수 효소와 막 단백질 그리고 막인지질 및 헤모글로빈의 자가 산화 (auto-oxidation)를 유도하여 용혈을 발생한다고 알려져 있다 (Chakrabarti *et al.*, 1995; Criswell *et al.*, 2000; Ferrali *et al.*, 1997). 적혈구 용혈 작용 외에 이것은 간장 실질세포의 미토콘드리아 (mitochondria) 변성을 유도하여 간장에 독성작용이 발현되는 것으로 알려져 있다 (Baruffaldi *et al.*, 1995). 그러나 본 실험의 용혈성 빈혈에서 간장 손상의 지표로 알려져 있는 총단백, ALT와 AST 수치의 유의한 변화가 관찰되지 않아 실험에 간장이 미칠 수 있는 영향은 미약할 것으로 사료되었다.

고등포유동물에서 출혈 후, 혈액성분은, 48 내지 72시간 내에 수분, 혈장 단백질, 백혈구 순으로 회복이 일어나고, 가장 나중에 적혈구수가 회복되는 것으로 알려져 있다 (Huh, 2004). 본 연구의 실험적 출혈성 빈혈에서는 31일 동안 혈장 단백질량의 회복이 완전하지 않았다. 본 실험기간 동안 절식하였으므로 혈장 단백질량의 회복이 절식과의 관련성은 배제할 수는 없지만, 혈장단백의 유지는 간장의 기능과 주로 관계되는 것으로 알려져 있기 때문에 (Evans, 1998) 간장의 합성분

비에 따른 보상능과의 관련성에 대하여 추구할 필요가 있다고 생각된다.

고등포유동물에서 빈혈 시 말초 순환 혈량의 20% 이상 급격한 감소에 따른 쇼크가 일어나거나 심각할 경우 사망에 이를 수 있다고 되어 있다 (Kumar *et al.*, 2005). 그러나 본 연구에서 출혈성 빈혈 유도시 일회 채혈량이 어체중의 1%에 해당하는 대량일 뿐 아니라, Ht치가 약 10%까지 감소하는 급격한 빈혈성 변화임에도 불구하고, 아가미 퇴색 외에 특기할 행동학적 이상을 포함한 임상 소견이 관찰되지 않았다. 이 같이 고등포유동물의 경우와 다른 소견을 보이는 것은, 말초 순환혈량 유지의 의미와 빈혈 내지 출혈성 빈혈의 병리학적 의의 및 영향에 있어 차이를 보일 수 있음을 암시하고 있다.

Ht와 Hb은 어종에 따라 다르다. Ht의 경우에 은어는 40-60%, 방어는 35-55%, 잉어와 무지개 송어는 30-50%이고, Hb의 경우에 은어와 방어 및 잉어는 8-13g/dℓ, 무지개 송어는 7-12g/dℓ이다 (박 & 오, 2001). 어종에 따라 그 수치는 다르지만 범위는 서로 유사하기 때문에 본 실험의 대조군 Ht와 Hb은 정상 수치로 생각하였다.

35일간의 회복 기간 후, 실험적 용혈성 빈혈과 출혈성 빈혈에서, Ht치는 거의 완전한 회복 경향을 보인 반면, Hb치는 각각 5.81g/dℓ, 4.89g/dℓ로, 대조군의 9.17g/dℓ까지 모두 회복하지 않았다. 이와 같은 결과는 연어과 어류에서 phenylhydrazine을 이용한 빈혈 실험에서도 관찰되었는데, 이것은 수온과 절식이 영향을 미친 결과라고 보고하였다 (Smith *et al.*, 1971). 내성양 넙치 (Atlantic

halibut)를 대상으로 한 실험에서 이 어종의 적온인 12-15℃에서 Ht치가 가장 높았다 (Langston, 2002). 수온이 낮은 늦가을에서 겨울철에는 적혈구의 수가 감소하고 수온이 증가하는 봄에서 여름에는 적혈구 수가 증가하는 경향이 있다고 알려져 있다 (Hardig & Hoglund, 1984). 수온이 낮으면 대사율이 느려지기 때문이다 (Smith *et al.*, 1971; Hardig & Hoglund, 1984). 그러나 본 실험에서는 실험 기간 동안 수온은 티라피아 적온이었고 일정하게 유지되었기 때문에 수온이 결과에 영향을 주지는 않았을 것이라고 생각된다. Zanjani *et al.* (1969)는 구라미를 10일 동안 기아 상태로 유지하여 적혈구 수, 헤모글로빈 양, 헤마토크리트 치가 대조군의 절반까지 감소하는 것을 확인하였고, Weinberg *et al.* (1976)는 채혈 후 절식한 개체에서 빈혈이 발생하여 유지되는 것을 발견하였다. Kawatsu (1974)는 채혈 후 110일 동안 절식한 개체에서 조혈 기능 감소를 확인하였는데, 이것은 오랜 기아로 인한 영양실조 때문이라고 하였다. 연어과 어류를 대상으로 한 실험에서 절식만으로는 Hb에 영향이 없었는데, 채혈 후 30일 동안 절식을 한 개체에서 Hb의 구성성분에 영향을 주어 말초에 성숙 적혈구보다 낮은 Hb 농도를 가진 적혈구가 존재한다고 보고하였다 (Lane, 1979; 1980). 본 실험에서 회복 기간 동안 대조군의 Hb 농도에 도달하지 못한 것은 절식으로 인하여 Hb 형성 또는 구성 요소에 영향을 받은 것으로 생각되며 이것에 대한 연구는 더 필요하다.

용혈성 빈혈과 출혈성 빈혈에서 모두, 빈혈 유도 시작 후 12일째에 나타나는 원형의, 중앙에 둥근 핵이 위치하며, 세포의 가장자리는 호염성을 나타내며, 세포질 염색성이 약하거나 거의 없는 이상 적혈구들이 출현하였다. 이 세포들에

대해 일부 문헌에서 언급하지만 상세한 설명이 없다 (Yosihinaga *et al.*, 2001). 형태적으로 포유류의 철결핍성 빈혈의 말초혈액에서 나타나는 'tired blood cell'과 유사하다 (Kumar *et al.*, 2005). 포유류에서 철결핍성 빈혈은 체내 저장철이 정상 적혈구 생성에 필요한 양보다 감소하거나, 정상 혈색소 합성에 이용되는 철이 충분하지 못할 경우에 발생한다. 장기간에 걸쳐 섭취되는 철의 양보다 손실되는 양이 많았을 때 저장철의 고갈이 오게 된다. 초기에는 정구성 정혈색소성 빈혈(normocytic normochromic anemia)에서 점차 소구성 저혈색소성 빈혈(microcytic hypochromic anemia)로 추이되며 이 때 크기가 작고 세포의 가장자리만 붉은 색을 띠는 'tired cell'이 출현하는 것으로 되어 있다 (Kumar *et al.*, 2005). 고등포유동물의 경우, 용혈성 빈혈에서는 철을 재이용할 수 있기 때문에 철결핍성 빈혈이 발생하지 않는 것으로 되어 있다 (Kumar *et al.*, 2005). 어류의 경우에도 같은 기전을 적용한다면 인위적 용혈로 유도한 티라피아의 용혈성 빈혈의 경우에도 철결핍성 빈혈이 일어날 가능성이 없다고 생각된다. 그러나 35일 후의 회복 개체에 이르기 까지, 신장 및 비장의 실질 및 MMC 내에 hemosiderin의 현저한 축적상태가 형태학적으로 확인되는 것으로 미루어, 철의 이용성 제한이 의심되며, 이로 인한 철결핍성 빈혈일 수도 있음을 배제할 수 없다.

포유류의 경우 세망적혈구 (reticulocyte)는 아주 미세한 염기성 망상 구조물 (basophilic reticulum: RNA)이 남아 있는 어린 적혈구로 성숙 적혈구보다 크다 (Ross *et al.*, 1995). 어류의 적혈구는 성숙 적혈구에서도 핵이 남아 있기 때문에 세망적혈구가 포유류와는 다르지만 일반적으로 말초혈액에서 보이는 미성

숙한 적혈구가 세망적혈구로 지칭된다. Groman (1982)는 성숙 적혈구보다 크며, 크고 또한 불규칙한 핵을 중앙에 가지고 있는, Giemsa 또는 Wright's 혈액 염색에 의해 세포질이 light blue-gray로 나타나는 세포를 어류에서의 세망적혈구라고 보고하였다. 그러나 Hibiya (1982)는 미성숙 적혈구는 둥글고, 성숙 적혈구보다 약간 작다고 하였으며, Ferguson (1989)은 어류의 적혈구는 성숙할수록 세포의 크기가 커진다고 하였다. 성숙 적혈구보다 작은 미성숙 적혈구들이 빈혈을 가진 어류 (Kawatsu, 1968) 또는 비타민 E 결핍 (Woodall *et al.*, 1964)에서 뚜렷하게 나타난다고 하였다. 더욱이 용혈성 또는 급성 출혈성 빈혈을 가진 어류에서 많이 관찰된다고 하였다 (Hibiya, 1982). 본 실험에서도 성숙 적혈구보다 크기가 작고 세포질이 옅으며 청색을 띠는 적혈구들이 관찰되었다. 하지만 그동안 정상 말초 혈액에서는 이와 같은 혈구들이 관찰되지 않았다. 이들은 빈혈이나 다른 질병 발생 시 나타나는 것으로 사료된다. 따라서 본 실험에서는 Diff-Quik 염색에 의해 성숙 적혈구와 형태는 같으나 크기가 더 크고 핵의 비율이 큰 적혈구와 원형이며 세포질이 blue-gray로 나타나는 세포를 미성숙 적혈구로 분류하였고 성숙 적혈구보다 크기가 작고 원형이며 세포질이 옅은 blue 또는 염색성이 없는 적혈구를 이상 적혈구로 구분하였다. 이와 같이 어류에서 미성숙 적혈구에 관한 보고는 문헌마다 설명이 다르다. 그러므로 어류의 빈혈을 정확하게 분류하기 위해서는 성숙 적혈구를 제외한 미성숙 적혈구의 분류를 명확하게 해야 할 필요가 있고, 미성숙 적혈구와 이상 적혈구를 구분해야 한다.

어류에서 용혈성 빈혈의 특징 중 하나는 비장에 hemosiderin이 축적되는 것이다. 그리고 심한 용혈성 빈혈의 경우, 비장 협조직에 색소가 두드러지고

MMC (melanomacrophage center) 내에 대량으로 축적된다고 알려져 있다 (Ferguson, 1989). 본 실험의 용혈성 빈혈에서도 이와 같은 소견이 관찰되었으며 두신에서도 hemosiderin의 축적이 관찰되었다. 고등포유류의 경우, 빈혈 시 철이 부족하게 되면 체내에 축적된 hemosiderin에서 철을 재사용하게 된다 (Kumar *et al.*, 2005). 그런데 적혈구가 파괴되는 초기뿐만 아니라 회복 단계에 있는 두신과 비장 조직에서도 여전히 hemosiderin 축적 정도가 일관되게 관찰된 것은 철의 재이용성에 문제가 있을 수 있음을 암시할 수 있는 소견이 될 수 있다.

고등동물에서 극심한 빈혈 시 간장은 지방변성과 함께 괴사가 동반된다고 알려져 있다 (Kumar *et al.*, 2005). 저산소는 세포의 손상을 일으키고 미토콘드리아의 기능이상을 야기시키는데, 이로 인해 지방산의 산화와 이용이 감소하여 triglycerides가 간세포 내에 축적된 것이다 (Jones *et al.*, 1983). 이 지방 변성은 산소분압이 낮은 중심정맥을 중심으로 일어나는 것으로 알려져 있다. 본 실험적 출혈성 빈혈어에서도 괴사소견은 두드러지지 않으나, 지방변화 소견이 고등동물과 유사하게 중심정맥 중심으로 관찰되었다. 그리고 본 실험의 용혈성 빈혈어에서도 저산소로 인한 단백대사 장애를 암시하는 중심정맥 주변의 초자적 변성이 관찰되었다. 그러나 이들 소견은 회복기간 동안 관찰되지 않은 것으로 보아 경미한 가역적 변성인 것으로 사료되었다.

본 실험의 출혈성 및 용혈성 빈혈의 두신에서 관찰되는 대식세포의 적혈구 포식상은 고등동물을 사용한 용혈성 실험에서 보고되어 있다 (Sorrell & Weiss, 1982; Datta *et al.*, 1989). 용혈성 빈혈의 경우에는 빈혈 유도초기부터, 출혈성

빈혈의 경우에는 세포질에 염색성이 없는 적혈구가 출혈하는 시기에, 본 소견이 관찰되는 것으로 보아, 용혈성 빈혈의 경우, phenylhydrazine에 의한 손상 적혈구가 초기부터 포식되며, 출혈성 및 용혈성 빈혈의 경우 모두, 이상적혈구가 포식되는 것으로 사료된다.

고등동물에서는 빈혈 시 심근의 지방 변성과 급성신부전이 쉽게 오며, 또한 신세뇨관 상피괴사가 나타나는 것으로 알려져 있다 (Kumar *et al.*, 2005). 본 실험에서는 이들 조직에서 병리조직학적 변화를 관찰할 수 없었다. 어류의 심장은 spongy층이 발달하여 심내강의 혈액으로부터 직접 산소를 취하는 것으로 되어 있다. 게다가 심근은 재생 능력이 있는 것으로 알려져 있다 (Hibiya, 1982; Ferguson, 1989). 어류의 신장은 신동맥 (renal artery) 공급만을 받는 고등동물의 것과는 달리, 두 가지 혈관 (renal artery, renal portal system) 공급을 받고 있다 (Hibiya, 1982). 즉, 고등 포유류와 같이 신동맥 (renal artery)에 의하여 사구체와 신세뇨관에 혈액 공급을 하고, 다른 하나는 미정맥으로부터 신세뇨관에 혈액을 공급하는 신문맥계 (renal portal system)이다. 따라서 어류는 병리학적 영향이 고등 포유류와 달리 Ht가 70%까지 감소해도 아가미 퇴색 외에는 임상 증상이 관찰되지 않고 (Ferguson, 1989) 빈혈로 인한 신장의 기능적 장애가 발생하지 않는 것으로 생각되었다.

고등동물에서 빈혈 시 보상 기전으로 심박동 수 증가, 세동맥 확장 및 순환속도 증가로 조직의 관류량이 증가한다고 알려져 있다 (Kumar *et al.*, 2005). 어류에서는 담수에서 무지개 송어의 Ht치가 70% 감소된 상태에서 심장 박출량을 증가시킴으로써 아가미를 통해 들어든 산소 운반 혈액량을 증가시키고 말초 혈관계 저항을 감소시킴으로써 산소를 조직에 정상적으로 공급한다는 보고가 있

으며 (Cameron & Davis, 1970), icefish (*Chaenocephalus aceratus*)는 혈색소가 없는 혈액의 산소 운반 능력이 해수의 산소 운반 능력과 같고 가스 운반을 전적으로 혈장에 의존한다는 보고도 있다 (Ruud, 1954). 따라서 Ht나 Hb 수치로 표현되는 빈혈의 병리학적 영향이 포유류의 경우에 비하여 심각하지 않을 수 있다고 생각되며, 빈혈의 일반적 정의를 어류에 그대로 적용하는 문제에 대하여도 검토가 필요한 것으로 사료되었다.

V. 요 약

나일 틸라피아(*Oreochromis niloticus*)에 실험적 출혈성 빈혈(EHA)과 용혈성 빈혈(ELA)을 제작하여 빈혈 과정과 회복 과정에서의 병리학적 차이 및 특성을 알기 위해서 본 실험을 수행하였다. EHA는 14일 동안 어체중의 약 1%에 해당하는 혈액을 4회에 걸친 미부 혈관(caudal vessel)으로부터의 반복 채혈하여 유도하였다. 한편, ELA는 1% phenylhydrazine을 0.05ml/어체중 100g 복강 주사하고 7일 후 동량을 반복 주사하여 유도하였다. 12일째에 EHA와 ELA의 Hematocrits(Ht)가 약 10%까지 감소하였고 Hemoglobin(Hb)양이 약 3g/dl까지 감소하였다. 회복 과정은 16일째부터 49일째까지로 하였다. 빈혈 및 회복 기간 동안 아가미의 빈혈성 퇴색외 특기할 임상 소견은 관찰되지 않았다. EHA의 경우 혈중 총단백량이 16일째에 2.2g/dl로 감소하여 38일째 까지 거의 회복되지 않았다. 두 빈혈 경우 모두 8일째에 미성숙 적혈구들이 출현하였고, 12일째에 세포질 염색성이 없는 적혈구들이 출현하기 시작하였으며 EHA의 경우 49일째까지 출현하였다. 간장에서 EHA의 경우에 12일째에서 38일째까지 중심정맥 중심성 지방변성이 확인되었고, ELA의 경우에 12일에서 26일까지 중심정맥 중심성 초자 변성이 확인되었다. EHA의 경우 12일째에 두신에서 조혈활성 소견이 확인되었으며, ELA의 경우에는 4일째부터 관찰되었다. 두신에서 적혈구 탐식 대식세포들이 EHA의 경우 16일째부터, ELA의 경우에는 2일째부터 관찰되었다. 비장 협조직(ellipsoid)의 비후 소견이 EHA의 경우 12일째부터, ELA의 경우에는 2일째부터 확인되었다. ELA의 경우 2일째에서 49일째까지 두신과 비장에서 hemosiderin 축적이 현저하였다. 49일째에 두 빈혈 경우 모두 Ht는 회복되었지만 Hb 양은 완전한 회복을 보이지 않았다. 이상의 결과를 종합하면 EHA는 정구성 저혈색소성 빈혈(normocytic hypochromic anemia)이고 ELA는 대구성 정혈색소성 빈혈(macrocytic normochromic anemia)로 나타났고, 회복기간 동안은 두 경우 모두 정구성 저혈색소성 빈혈(normocytic hypochromic anemia)로 나타났으며, EHA 및 ELA 모두 Hb의 회복은 Ht보다 느렸다. 간장에서 관찰된 중심정맥 중심성 변성은 EHA에서 다소 오래 지속되었으나 49일째에는 EHA 및 ELA 경우 모두 완전 회복되었다.

표제어: 빈혈 · 회복 · 틸라피아 · phenylhydrazine · *Oreochromis niloticus*

VI. 결과그림 및 그림설명

Fig. 1

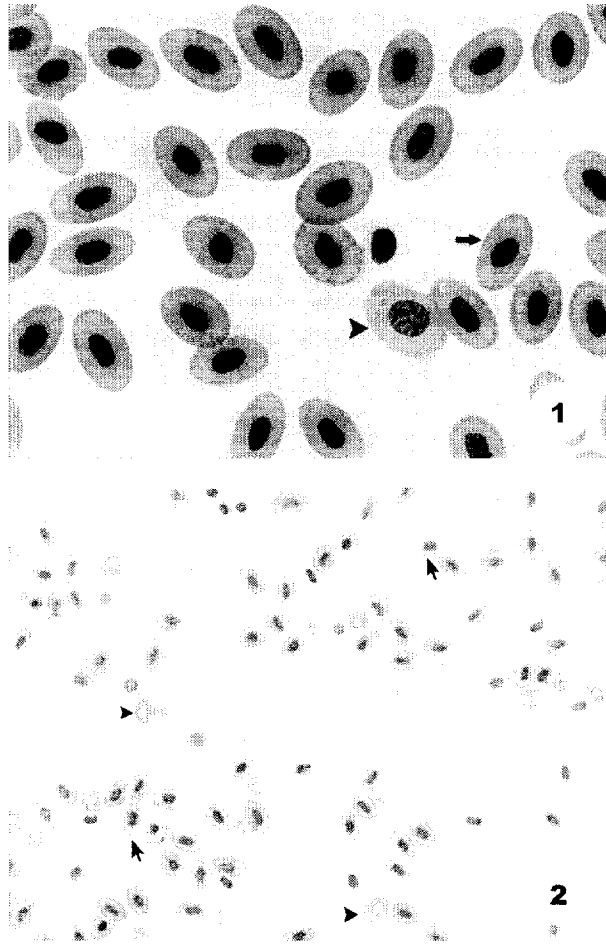


Fig. 1. Peripheral blood from control and hemolytic anemic individuals.

Fig. 1-1. Peripheral blood from control individuals. Arrow: mature erythrocyte, Arrow head: immature erythrocyte. Diff-Quik stain, $\times 1000$.

Fig. 1-2. Peripheral blood from hemolytic anemic individuals on the 2nd days. Note a number of degenerative erythrocytes. Arrow: erythrocyte with vacuolation in cytoplasm, Arrow head: erythrocyte with exclusion of nucleus. Diff-Quik stain, $\times 400$.

Fig. 2.

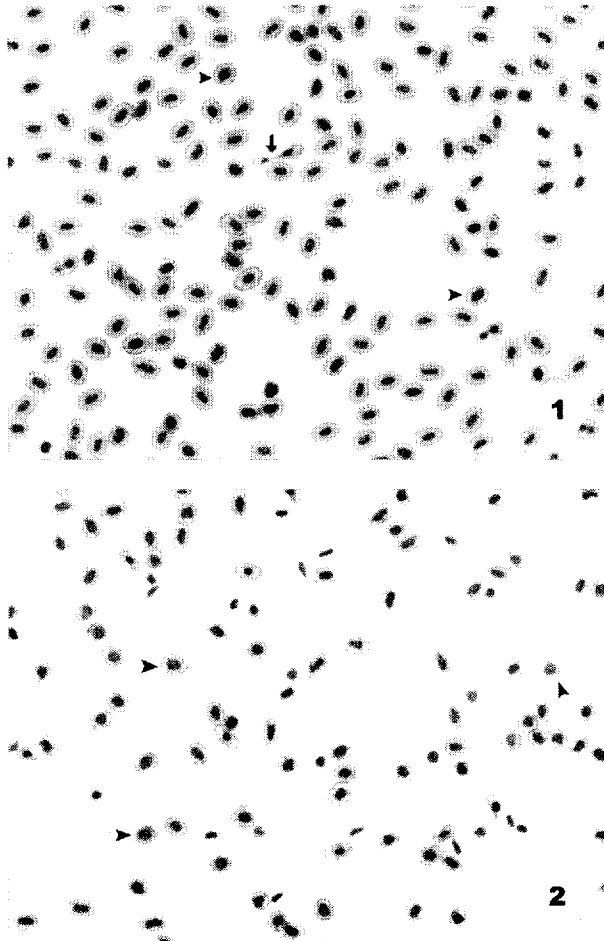


Fig. 2. Peripheral blood from hemorrhagic and hemolytic anemic individuals on the 8th days. Note the increased basophilic immature erythrocytes.

Fig. 2-1. Peripheral blood from hemorrhagic anemic individuals. Arrow: lobular erythrocyte, Arrow head: basophilic immature erythrocyte. Diff-Quik stain, $\times 400$.

Fig. 2-2. Peripheral blood from hemolytic anemic individuals. Arrow head: basophilic immature erythrocyte. Diff-Quik stain, $\times 400$.

Fig. 3.

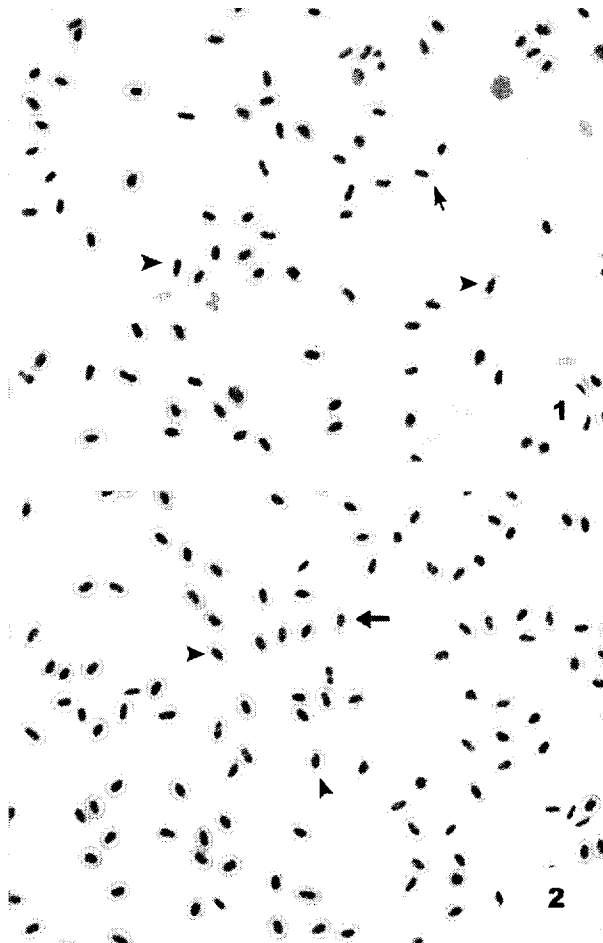


Fig. 3. Peripheral blood from hemorrhagic and hemolytic anemic individuals on the 12th days. Note the increased abnormal erythrocytes.

Fig. 3-1. Peripheral blood from hemorrhagic anemic individuals. Arrow: mature erythrocyte, Arrow head: erythrocyte with stainless cytoplasm. Diff-Quik stain, $\times 400$.

Fig. 3-2. Peripheral blood from hemolytic anemic individuals. Arrow: mature erythrocyte, Arrow head: erythrocyte with stainless cytoplasm, Diff-Quik stain, $\times 400$.

Fig. 4.

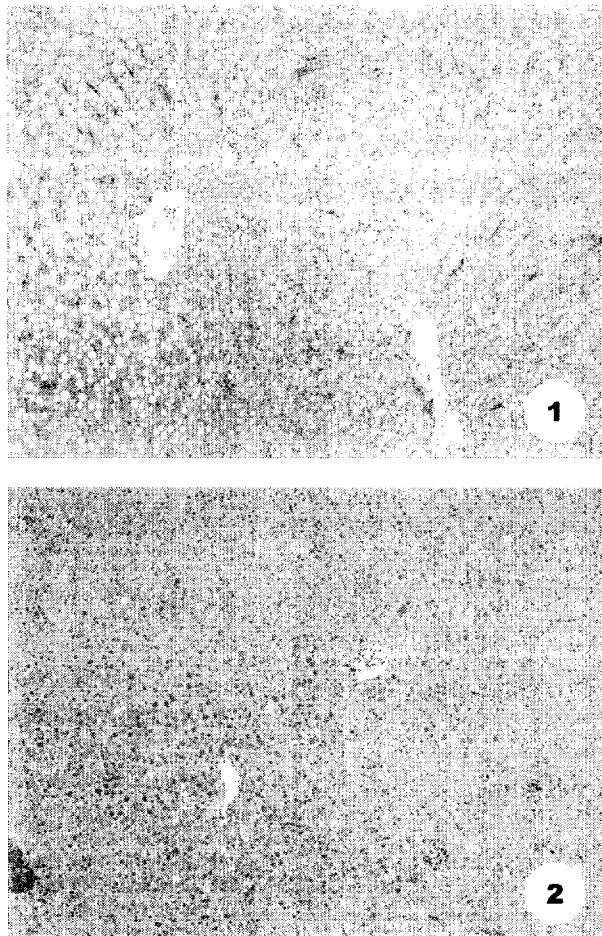


Fig. 4. Histological features of liver from hemorrhagic and hemolytic anemic individuals.

Fig. 4-1. Note the fatty changes of hepatocytes around central veins from hemorrhagic anemic individuals on the 12th days. H&E stain, $\times 100$.

Fig. 4-2. Note the hyaline changes of hepatocytes around central veins from hemolytic anemic individuals on the 12th days. H&E stain, $\times 100$.

Fig. 5.

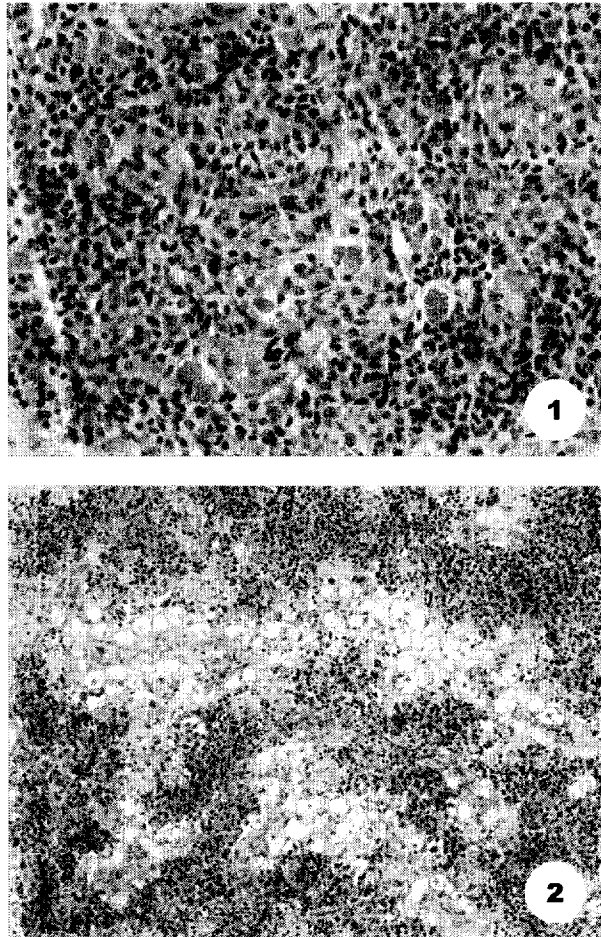


Fig. 5. Histological features of spleen from hemorrhagic and hemolytic anemic individuals.

Fig. 5-1. Note the activated ellipsoids in spleen from hemorrhagic anemic individuals on the 20th days. H&E stain, $\times 400$.

Fig. 5-2. Note the activated ellipsoids in spleen from hemolytic anemic individuals on the 4th days. H&E stain, $\times 200$.

Fig. 6.

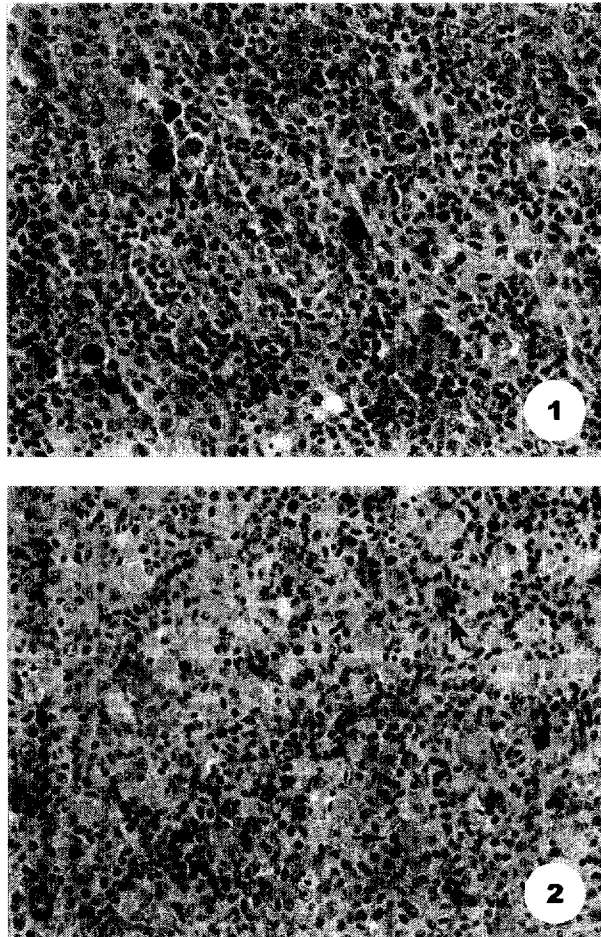


Fig. 6. Histological features of head kidney from hemorrhagic and hemolytic anemic individuals.

Fig. 6-1. Abnormal erythrocytes are engulfed by phagocytes in head kidney from hemorrhagic anemic individuals on the 26th days. Arrow: Phagocytes engulfing erythrocytes. H&E stain, $\times 400$.

Fig. 6-2. Abnormal erythrocytes are engulfed by phagocytes in head kidney from hemolytic anemic individuals on the 2nd days. Arrow: Phagocytes engulfing erythrocytes. H&E stain, $\times 400$.

Fig. 7.

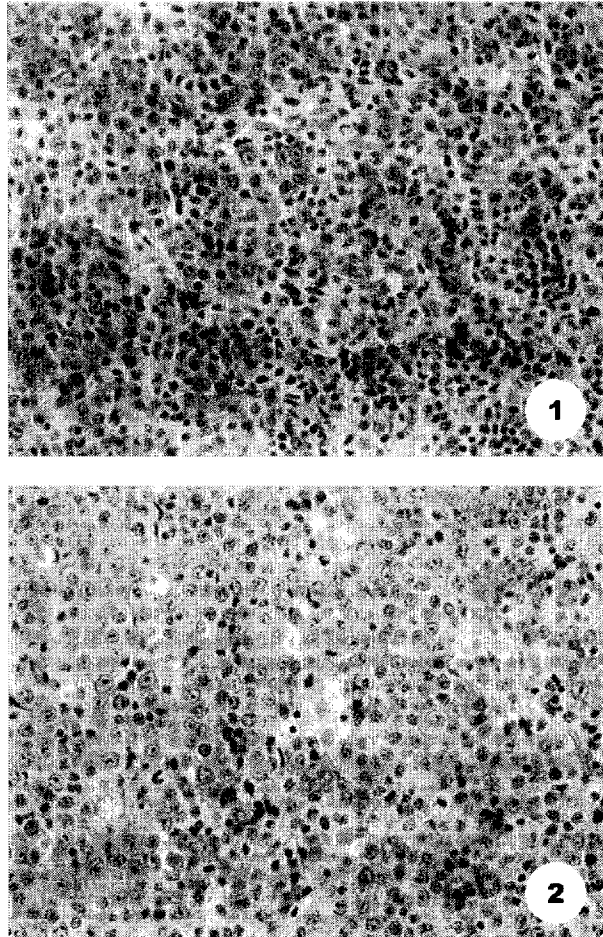


Fig. 7. Histological features of head kidney from hemorrhagic and hemolytic anemic individuals.

Fig. 7-1. Note the activated hemopoiesis of head kidney from hemorrhagic anemic individuals on the 12th days. H&E stain, $\times 400$.

Fig. 7-2. Note the activated hemopoiesis of head kidney from hemolytic anemic individuals on the 2nd days. H&E stain, $\times 400$.

Fig. 8.

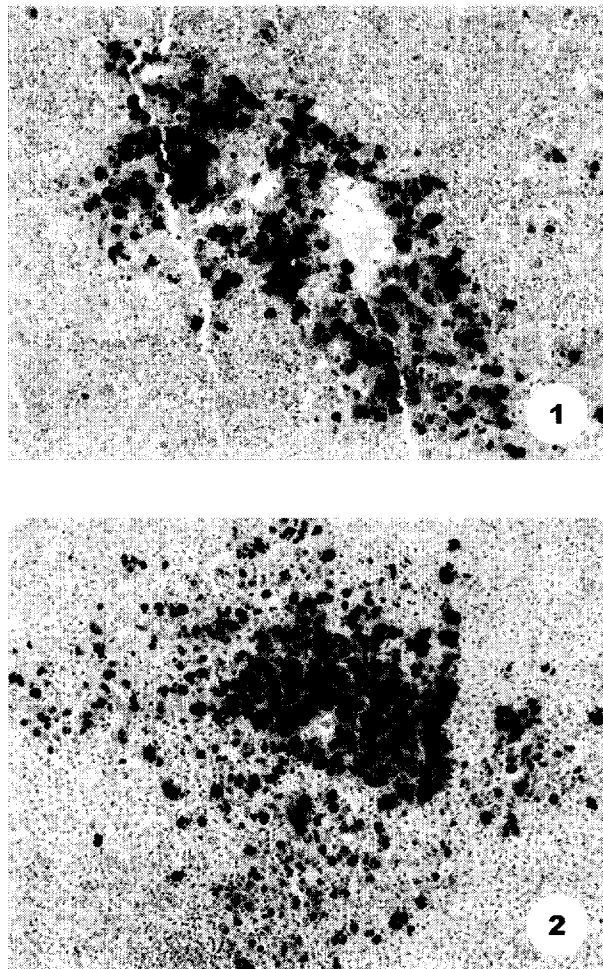


Fig. 8. Histological features of spleen and head kidney from hemolytic anemic individuals. Prussian blue reaction for hemosiderin.

Fig. 8-1. Spleen on the 2nd days. Note a large amount of hemosiderin in MMC in ellipsoid and parenchyma. $\times 200$.

Fig. 8-2. Head kidney on the 49th days. Note a large amount of hemosiderin in MMC in parenchyma. $\times 200$.

VII. 감사의 글

학위논문 실험을 하는 동안 힘들기도 하고 어려움도 있었지만 많은 분들의 도움과 격려를 받아 논문을 완성하게 되었습니다. 그 분들께 감사드립니다.

전공 지식뿐만 아니라 넓은 눈과 깊은 생각을 가질 수 있도록 많은 이야기를 해주신 허민도 선생님께 감사드리며, 제 논문에 관심과 조언을 주셨던 강주찬 선생님과 김기홍 선생님, 그리고 학부와 석사 과정 동안 많은 가르침을 주신 박수일 선생님, 정준기 선생님, 정현도 선생님께 진심으로 감사드립니다.

대학원 입학 선배이지만 졸업 동기가 된 혜정이 언니, 그래서 제 투정과 속상함을 이해해주고 제게 힘이 되어 준 언니께 제 마음을 전합니다. 힘들고 껴안은 일 있을 때마다 말없이 도와주신 이부근 선배님과 제가 실험을 할 수 있도록 무더운 여름에 옷을 젖어가며 틸라피아를 분양해 주신 양식학과 양어장 가족들 그리고 땀 흘리며 틸라피아 운반을 도와주신 이상환 선배님과 성일씨께 감사드립니다. 힘든 시기에 함께 있어준 정숙진 후배님께 감사를 드리며 좋은 일이 있기를 바랍니다. 실험실 생활을 하면서 회노애락을 함께한 강형길, 류갑민, 남성진, 박명환, 강효주, 최희정 선배님들과 지연, 성자, 주희에게 감사의 말을 전하며, 병리방의 새로운 꽃이 될 우승이, 경민이, 한나양에게도 감사드립니다.

논문 핑계로 자주 만나주지 않았던 친구를 항상 챙겨 준 현아, 명진이, 연자, 기백이, 쑹이, 철현이, 주혁이, 동오, 효진이, 순림이, 효경이 그 외 소리빛깔 12기 동기들에게 감사의 마음을 전합니다. 마지막으로 지금까지 그 무엇보다 더 큰 힘이 되어준 부모님과 동생 은영이에게 감사드립니다.

Ⅶ. 참 고 문 헌

- Baruffaldi A, Cervellati F, Lanzara V, Cucchi C (1995) Liver damage due to the administration of phenylhydrazine in *Ictalurus* species. *Cytobios* 83(334): 187-194.
- Cameron JN, Davis JC (1970) Gas exchange in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) with varying blood oxygen capacity. *J Fish Res Bd Canada* 27: 1069-1085.
- Chakrabarti S, Sonaye B, Naik AA, Nadkarni PP(1995) Erythrocytic membrane protein damage by oxidation products of phenylhydrazine. *Biochem Mol Bio Inter* 35(2): 255-263.
- Criswell KA, Sulkanen AP, Hochbaum AF, Bleavins MR (2000) Effects of phenylhydrazine or phlebotomy on peripheral blood, bone marrow and erythropoietin in Wistar Rats. *J Appl Toxicol* 20: 25-34.
- Datta K, Soni JL, Awadhiya RP, Datta IC (1989) Erythrophagocytosis in phenylhydrazine induced acute anaemia in chickens. *Rec Vet Sci* 47: 136-137.
- Evans DH (1998) The physiology of fishes. Second edition. CRC Press LLC. USA.
- Ferguson HW (1989) Systemic pathology of fish. Iowa state university. USA.
- Ferrali M, Signorini C, Sugherini L, Pompella A, Lodovici M, Caciotti B, Ciccoli L, Comporti M (1997) Release of free, redox-active iron in the liver and DNA oxidative damage following phenylhydrazine intoxication.

- Biochem Pharmacol 53: 1743-1751.
- Groman DB (1982) Histology of the striped bass. American fisheries society. USA.
- Hardig J, Hoglund LB (1984) Seasonal variation in blood components of reared Baltic salmon, *Salmo salar* L. J Fish Biol 24: 565-579.
- Hibiya T (1982) An Atlas of Fish Histology Normal and Pathological Features. Kodansha Ltd, Japan.
- Houston AH, Murad A, Gray JD (1988) Induction of anemia in goldfish, *Carassius auratus* L., by immersion in phenylhydrazine hydrochloride. Can J Zool 66: 729-736.
- Huh MD (2004) Lecture note: Systemic fish pathology. Laboratory of fish & shellfish pathology.
- Jones TC, Hunt RD, King NW (1997) Veterinary Pathology. sixth edition. Williams & Wilkins, USA.
- Kawatsu H (1968) Haemorrhagic anemia of rainbow trout induced by repeated bleedings. Studies on the anemia of fish-II. Bull Freshwat Fish Res Lab 18: 61-66.
- Kawatsu H (1971) Hemolytic anemia of common carp induced by injections of phenylhydrazine hydrochloride. Studies on the anemia of fish-IV. Bull Freshwat Fish Res Lab 21: 139-149.
- Kawatsu H (1972) Dietary iron deficient anemia in brook trout. Studies on the anemia of fish-V. Bull Freshwat Fish Res Lab 22: 59-67.

- Kawatsu H (1974) Further note on the anemia caused by starvation in rainbow trout. Studies on the anemia of fish-VI. Bull Freshwat Fish Res Lab 24: 89-94.
- Koong AC, Hirst DG (1991) The influence of chronic anemia on the radiosensitivity of two mouse tumors. Br J Cancer 63: 499-502.
- Kumar V, Abbas Ak, Fausto N (2005) Robins and Cotran pathologic Basis Of Disease. 7th edition. Elsevier Inc. USA.
- Lane HC (1979) Some haematological responses of normal and splenectomized rainbow trout *Salmo gairdneri* to a 12% blood loss. J Fish Biol 14: 159-164.
- Langston AL, Hoare R, Stefansson M, Fitzgerald R, Wergeland H, Mulcahy M (2002) The effect of temperature on non-specific defence parameters of three strains of juvenile Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.). Fish Shellfish Immunol 12: 61-76.
- Lane HC (1980) The responses of the haemoglobin system of fed and starved rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, to bleeding. J Fish Biol 16: 405-411.
- Mayani H, Lois LA, Medellin JM (1991) Rabbit erythropoiesis during recovery from chronic anaemia induced by bleeding. Arch Invest Med 22: 317-322.
- McCormack M, Nias AHW, Simth E (1990) Chronic anemia, hyperbaric oxygen and tumor radiosensitivity. Br J Radiol 63: 752-758.

- Redondo PA, Alvarez AI, Diez C, Fernandez-Rojo F, Prieto JG (1995) Physiological response to experimentally induced anemia in rats: a comparative study. *Lab Anim Sci* 45(5): 578-583.
- Roberts RJ (2001) *Fish pathology*. Third edition. WB Saunders. London.
- Ross MH, Romrell LJ, Kaye GI (1995) *Histology: A text and atlas*. Third edition. Williams & Wilkins. USA.
- Ruud JT (1954) Vertebrates without erythrocytes and blood pigment. *Nature* 173(4410): 848-850.
- Sorrell JM, Weiss L (1982) Development of the embryonic chick phagocytic system: intraembryonic erythrophagocytosis induced by phenylhydrazine. *J Morphol* 171(2): 183-194.
- Smith CE, McLain LR, Zaugg WS (1971) Phenylhydrazine-induced anemia in chinook salmon. *Toxicol Appl Pharmacol* 20(1): 73-81.
- Steen JB, Berg T (1966) The gills of two species of haemoglobin free fishes compared to those of other teleosts: with a note on severe anaemia in an eel. *Comp Biochem physiol* 18: 517-526.
- Yoshinaga T, Kamaishi T, Segawa I, Yamano K, Ikeda H, Sorimachi M (2001) Anemia caused by challenges with the monogenean *Neoheterobothrium hirame* in the Japanese Flounder. *Fish pathol* 39(1): 13-20.
- Yoshinaga T, Kamaishi T, Ikeda H, Sorimachi M (2001) Experimental recovery from anemia in Japanese Flounder challenged with the monogenean *Neoheterobothrium hirame*. *Fish pathol* 36(3): 179-182.

- Weinberg SR, Lobue J, Siegel CD, Gordon AS (1972) Hematopoiesis of the kissing gourami (*Helostoma temminckii*). Effects of starvation, bleeding, and plasma-stimulating factors on its erythropoiesis. Can J Zool 54: 1115-1127.
- Woodall AN, Ashley LM, Halver JE, Olcott HS, Vanderveen J (1964) Nutrition of Salmonid fishes-XIII. The α -tocopherol requirement of chinook salmon. J Nutr 84: 125-135.
- 박성우, 오명주 (2001) 수족혈액학. 도서출판 대경. 대전. pp. 67