

이학석사 학위논문

나일틸라피아(*Oreochromis niloticus*)의
실험적 출혈성 빈혈에 관한 임상병리

지도교수 허 민 도

이 논문을 이 학위논문으로 제출함



2004년 2월

부경대학교 대학원

어 병 학 과

이 재 영

이재영의 이학석사 학위논문을 인준함

2003년 12월

주 심 이학박사 정 준 기 인 

부 심 이학박사 정 현 도 인 

위 원 농학박사 허 민 도 

목 차

Abstract	i
I. 서론	1
II. 재료 및 방법	4
1. 실험어 및 유지	4
2. 임상적 정상개체 선발	4
3. 빈혈의 유도 및 임상소견 관찰	4
4. 혈액학적 조사	6
(1) 혈액 생화학 파라메타 측정	6
(2) 혈액 세포학적 파라메타 측정	6
5. 병리조직학적 조사	8
(1) 조직 스탬프를 사용한 두신과 비장 표본 제작 및 관찰	8
(2) 광학현미경 표본제작 및 관찰	8
6. 유의성 검정	8
III. 결과	9
1. 임상증상	9
2. Hematocrit(Ht) 및 Hemoglobin(Hb)치의 변화	9
3. 말초혈액 소견	9
(1) 혈액 세포학적 파라메타의 변화	9
(2) 혈구 형태의 변화	10
(3) 혈액 생화학적 파라메타의 변화	10
4. 병리조직학적 소견	15
(1) 두신과 비장의 스탬프 소견	15

(2) 장기 및 조직의 광학현미경적 소견	16
IV. 고찰	18
V. 요약	25
VI. 결과그림 및 그림설명	26
VII. 감사의 글	40
VIII. 참고 문헌	41

Clinical pathology on experimental hemorrhagic anemia of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*.

Jae-young Lee

Department of Fish Pathology, Graduate School

Pukyong National University

Abstract

To investigate part of pathological effect of anemia, Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, with experimentally induced hemorrhagic anemia were hematologically and histopathologically examined. Anemic conditions were induced by the repeated bleeding through caudal vein. Bleedings were carried out 8 times at a 4 day interval during 32 days with a volume of about 1% of body weight, which resulted in severe microcytic hypochromic anemia. Total serum protein significantly decreased but there were no significant changes in alanine transaminase and aspartate transaminase. Clinically anemic fish showed pale gills, local loss of scales, and anemic discoloration of liver and hemopoietic tissues. Immature erythrocytes started to increase significantly in peripheral blood after the 3rd bleeding.

Dumbbell-shaped erythrocyte continued to appear after the 2nd bleeding. Histologically liver showed fatty change around central veins. Erythrocytic cell series increased in both head kidney and spleen. Many macrophages engulfing several erythrocytes were found in sinuses of head kidneys of some anemic fish. Histological alterations were prominent after the 7th bleeding with the edematous swelling of epicardium and meninges, focal dilation of gastric glandular tubules. These results suggest that the anemic type by hemorrhage be similar to that of mammals, but the pathological effect of anemia be somewhat different.

Key words: Nile tilapia · *Oreochromis niloticus* · Hemorrhagic anemia ·

Microcytic hypochromic anemia.

I. 서 론

어류에서 적혈구수 감소에 따른 빈혈은 비교적 심한 경우 아가미의 색조가 창백해 보이거나 hematocrit 측정 시 모세관 내 혈액의 색조나 슬라이드 도말시 혈액의 물성으로 쉽게 알 수 있다. 빈혈의 정도는 hematocrit 측정치 통하거나 적혈구 수나 hemoglobin치를 분석함으로써 판단할 수 있다.

어류에서도 고등포유류에서와 같이 출혈성(hemorrhagic), 용혈성(hemolytic), 결핍성 또는 영양성, 재생불량성(hypoplastic) 및 골수로성(myelophthistic) 빈혈을 언급하고 있다(Ferguson, 1989). 이 중 특히 출혈성 및 용혈성 빈혈은 각종 어류 질병에서 흔히 동반되는 것으로 알려져 있다. 그리고 결핍성 및 영양성 빈혈의 원인으로 적혈구 형성에 필요한 사료 내 철(Kawatsu, 1972), 니코틴산(Andrew and Murai, 1978), 비타민 E(Lovell *et al.*, 1984), 엽산(Simith, 1968; Butterworth *et al.*, 1986)결핍 및 기아(Weinberg *et al.*, 1976; Kawatsu, 1974)가 보고되었다.

빈혈의 영향에 관한 실험적 연구는 포유류에서 많이 이루어져 있는 반면 어류에서 그 예가 흔하지 않다. 실험적 빈혈에 대한 영향을 평가하기 위하여 주로 실험동물을 주로 사용하였으며, 채혈 또는 phenylhydrazine과 같은 용혈성 물질 주사를 통하여 빈혈을 유도하였다. 그 외 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). 이와 같은 실험적 빈혈을 통하여 골수에서 적혈구 계 세포의 증수와 말초 혈액에서 많은 미성숙 적혈구가 출현하며, 간장과 심장

에서 수외조혈(extramedullary hemopoiesis) 현상이 관찰되었다. Mayani 등 (1991)은 만성 빈혈을 유도하여 in vivo와 in vitro에서 적혈구 선생과 조혈 조직의 세포학적 변화에 대하여 경시적으로 관찰하였다. 포유류에서는 빈혈의 영향으로 피부는 창백해지고, 상피와 진피의 위축으로 얇아져 탄력성이 없어졌다. 특히 손톱과 발톱이 부서지기 쉬우며, 그 볼록한 형태를 유지하기 어렵게 되었다. 간장 및 신세뇨관의 상피와 심장의 심근세포에서 지방변성 또는 경색괴사가 관찰되었음을 언급하고 있다(Cotran *et al*, 1999).

어류의 경우에는 무지개 송어, 금붕어, 블루 구라미, 잉어 및 메기를 대상으로 실험적 빈혈을 유도한 예가 있으며(Zanjani *et al.*, 1969; Smith *et al.*, 1971; Weinberg *et al.*, 1976; McLeod *et al.*, 1978; Lane, 1979; Houston *et al*, 1987), 조혈조직 내 조혈활성 증가 소견을 기술하고 있다. Kawatsu(1968, 1971, 1972, 1974)는 출혈성, 용혈성, 철 결핍성 및 기아에 따른 빈혈을 실험적으로 유도하였다. 이들 연구에서 빈혈 유형에 대한 언급은 있지만, 어류 조직의 저산소증에 기인한 어체의 병리학적 영향에 관한 연구나 언급은 없었다.

어류는 포유동물과 비교하여 적혈구 수 및 혈액량이 크게 적은 것으로 알려져 있다(Ferguson, 1989). 최근 어류에 임파관계가 없고 그 대신 Ht치가 크게 낮은(약 4%) 2차 순환계가 존재한다는 사실이 정설화 되고 있다. 어류는 극단적인 빈혈 상황에서도 생존할 수 있는 능력(Wood *et al.*, 1979), 적혈구의 낮은 교체율(Fischer *et al.*, 1998), 심근의 산소의존성의 차이(Ferguson, 1989), 신장의 신문맥계(renal portal system)의 존재(Hibiya, 1982), 혈구생성에 미치는 수온의 영향(Chudzik and Houston, 1982), 혈액 구성 성분의 계절적 변화(Hardig and Hoglund, 1984) 등의 해부생리학적 상위성이 알려져 있다. 따라서 어류의

빈혈이 어체에 미치는 병리학적 영향에 대하여 포유류의 경우를 그대로 적용함으로써 해석의 오류를 범할 수 있을 것으로 본다.

따라서 본 연구에서는 어류에 대하여 다회 채혈을 실시하여 극단적인 출혈성 빈혈을 유도하고, 빈혈의 유형을 경시적으로 평가하는 동시에 숙주에 미칠 수 있는 영향을 혈액학적 및 병리조직학적 방법을 통하여 평가하고자 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 실험어 및 유지

담수열대어종의 하나인 Nile tilapia(*Oreochromis niloticus*)를 실험어로 선택하여 부경대학교 부속양어장에서 양식되고 있는 임상적으로 건강한 체중 150~200g 틸라피아를 선별한 후, 실험실내 순환 여과식 수조에 수용하여 급이하면서, 어류의 이동에 따른 스트레스를 최소화하기 위해서 1주일간 순치 과정을 두었다. 실험은 순환 여과 시스템 내에서 이루어졌고, 산소 공급은 포기(aeration)를 통하여 이루어졌다. 실험기간 동안의 수온은 $24.0 \pm 1.5^{\circ}\text{C}$ 를 유지하였고, 용존 산소는 6.8~7.0 ppm, pH는 6.0~6.4이었다.

2. 임상적 정상 개체 선별

실험 전에 TSA 배지로 실험어의 세균학적인 조사와 조직학적 조사를 한 결과 이상이 없었으며, 이들 어류를 대상으로 Ht치를 측정하여 20~35 % 범위 안에 들어가는 개체 33마리를 선별하였다.

3. 빈혈의 유도 및 임상 소견 관찰

빈혈 유도를 위한 채혈 과정 동안의 혈액분석과 조직검사를 위한 부검의 개체수를 Table 1에 나타내었다. 빈혈유도 기간 동안 일체 사료는 급여하지 않았다. 총 30마리 중 27마리에 대하여 체중의 1%에 해당하는 1회 짜 채혈을 시작하였다. 대조로서 hematocrit(Ht) 및 hemoglobin(Hb) 측정하기 위하여 1회 짜 채혈 혈액의 일부를 남기고, 나머지 3마리에 대하여는 Ht 및 Hb치 측정에 필요한 혈액만을 취하고 즉시 부검하여 조직검사를 위하여 Bouin액에 고정하였다.

Table 1. Numbers of blood-sampled and necropsied fish on bleeding schedule for induction of experimental hemorrhagic anemia of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*

Sampling		Number of blood-sampled fish	Number of necropsied fish	Group
Before bleeding	[0]	30	3	Control A
1st	[4]	26(1)	3	
2nd	[8]	23	3	
3rd	[12]	20	3	
4th	[16]	17	3	
5th	[20]	13(1)	3	
6th	[24]	10	3	
7th	[28]	7(1)	3	
8th	[32]	4	3	
Non-bleeding fish		[32]	3	Control B

(): Number of fish died after previous bleeding,

Days: Days after first bleeding

이후 4일째마다 7회에 걸쳐 빈혈유도를 위한 다량의 채혈(체중의 1%)을 실시하는 동시에 혈액분석을 실시하고, 각 채혈 시마다 3마리는 혈액분석을 위한 채혈 후 부검·고정하였다. 따라서 32일 동안 4일마다 총 8회에 걸친 반복 채혈이었으며, 결과적으로 중 총 30마리에 대하여 1개의 대조군(대조군 A)과 8개의 실험군으로 나뉘었다. 한편, 틸라피아 3마리를 대조군 B로 하여 채혈 군과는 분리하여 최종인 8회 채혈 4일 후까지 절식시키면서 유지시켜 혈액을 분석하는 동시에 조직검사를 위하여 부검·고정하였다.

채혈은 무마취하에서 실시하였으며, 물에 적신 수건 위에 어류를 놓힌 다음 한 손으로 부드럽게 어류를 고정하고, 다른 한 손으로 미정맥(caudal vein)으로부터 신속히 채혈을 하였다. 이 때 혈액 응고 방지제인 heparin(25,000 I.U., 중외제약)을 처리한 3ml 1회용 주사기를 사용하였으며, 바늘 삽입 후 30초 이내에 소정량(어체중의 1%)의 혈액을 채취하였다(Weinberg, 1972). 채혈과정은 항상 오후 4~6시 사이에 이루어졌으며, 전 과정이 무균적 조건 하에서 이루어졌다.

채혈 후, 각 개체의 등지느러미에 표함(tagging)으로서, 개체의 구분과 함께 개체별 임상소견 관찰이 용이하도록 하였다. 임상소견은 채혈 직후부터 1일 동안은 자주 관찰하였다. 부검 개체에 대하여는 간장과, 조절조직인 비장, 두신 및 신장에 대한 색조의 변화 내용을 관찰하였다.

4. 혈액학적 조사

(1) 혈액 생화학 파라메타 측정

실험에 사용한 혈청은 위의 채혈 방법을 통해 채취된 혈액을 1시간 동안 실온에 방치한 후 4℃에서 2시간동안 두어 혈병을 수축시킨 후 3,000 rpm에서 5분간 원심분리 하고 혈청을 분리하여 실험에 바로 사용하거나, -20℃에서 냉동보관하면서 automated dry chemical system(Kodak Ektachem 700, Rochester, New York)으로 3일 이내 녹여서 혈청 중 TP(total protein), ALT(alanine transaminase) 및 AST(aspartate transaminase)수치를 측정하였다.

(2) 혈액 세포학적 파라메타 측정

① 위의 방법 하에 채혈한 혈액으로 적혈구 수, hematocrit(Ht) 및 hemoglobin(Hb)량을 각각 측정하였다. 적혈구(Red Blood Cell)수는 Hendrick's diluting solution으로 Ht의 감소에 따라 희석 비율을 낮추면서 1:800부터 1:100으로 희석한 후, hemocytometer(Improved Neubauer, Germany)를 이용하여 광학 현미경하에서 계수 하였다. Ht는 헤파린 처리된 capillary tube으로 신속히 흡인한 후 한 쪽 끝을 봉한 후, microhematocrit centrifuge(Model; 01501, HAWKSLEY AND SONS Ltd., England)를 사용하여 12,000rpm에서 5분간 원심 침적 시켜 1분 이내 Adams microhematocrit reader로 측정한다. Hb은 임상

용 Kit(sigma. Co)를 사용하여 Cyan-methemoglobin법으로 측정하였다.

② 평균 적혈구 용적(mean corpuscular volume, MCV), 평균 적혈구 혈색소 농도(mean corpuscular hemoglobin concentration, MCHC), 및 평균 적혈구 헤모글로빈량(mean corpuscular hemoglobin, MCH)을 아래의 계산식에 의하여 구하였다.

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

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

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

③ 혈액 도말 표본에 대한 혈구의 분포 및 형태 변화에 대한 관찰

혈액 조직 내 출혈성 빈혈에 의한 혈구 세포의 수, 형태학적인 변화를 관찰하기 위해서 미부 정맥에서 혈액을 채취하여 smear한 후 Diff-Quik 염색과 PAS 염색을 하였다. 각 빈혈 단계마다 총 적혈구 1000개 당 정상 적혈구, 미성숙 적혈구(미성숙 적혈구, 이상 적혈구), 아령모양(dumbbell-shaped) 적혈구에 대한

분별계수를 한 후 퍼센트를 계산하였다.

5. 병리조직학적 조사

(1) 조직 스탬프를 사용한 두신과 비장 표본 제작 및 관찰

두신과 비장 조직을 반으로 절개한 다음 깨끗이 처리된 슬라이드에 스탬프를 하였고, Diff-Quik 염색과 PAS 염색을 실시한 후, 두신 내 조혈세포를 관찰하였다.

(2) 광학현미경 표본 제작 및 관찰

단일 채혈부터 8회 채혈에 이르기까지 매 채혈 후 3 마리씩 선별하여 부검을 하였다. 해부를 하여 세균학적인 검사를 한 후, 전 조직을 Bouin's solution과 Carnoy solution에 고정하였다. 24시간 후 동 고정 액에 24시간 동안 이차 고정이 이어진 후, 조직을 수세를 하고 70%에서 100%까지 순차 농도 알코올에 탈수를 하였다. Xylene 투명 화하여 파라핀 친화시키고, 파라핀 포매 후 microtome (Reichert-Jung 820, Leica)을 사용하여 약 4 μ m두께의 박편을 얻었다. 이를 H&E염색하여 광학현미경으로 관찰하였으며 필요에 따라 PAS와 prussian blue의 특수 염색법을 적용하였다.

6. 유의성 검정

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

III. 결 과

1. 임상증상

빈혈 증상은 아가미와 혈액의 색조가 매우 창백했으며(Fig. 1-1), 5회 이상 채혈한 개체에서 육안적으로 체표의 비늘이 국소적으로 탈락을 보였으며(Fig. 1-2), 수조 바닥에서도 다량의 탈락 비늘을 관찰할 수 있었다. 부검에서는 조혈조직인 두신과 비장의 색조가 검붉은 색에서 옅은 핑크색으로 변했으며, 간장의 색조 변화도 채혈 전의 짙은 갈색에서 밝은 갈색으로 색조의 변화가 확인되었다(Fig. 1-1).

2. Hematocrit(Ht) 및 Hemoglobin(Hb)치의 변화

임상적으로 정상으로 확인된 총 30마리 틸라피아의 혈액학적 파라메타에서 평균 Ht치는 26.5%이었으며, 평균 Hb 양은 8.8g/dl이었다(Table 2). 매 4일 마다 어체중의 약 1%로 반복 채혈을 하여 3회 채혈 이후 4일째에 평균 Ht치와 Hb 양이 각각 8.9%, 3.1g/dl로 낮추어졌으며, 32일 동안 총 8회에 이르는 반복 채혈 결과 평균 Ht치와 Hb양은 각각 2.7%, 0.9g/dl로 낮아졌다.

3. 말초혈액 소견

(1) 혈액 세포학적 파라메타의 변화

매 채혈 시마다 틸라피아의 적혈구 수, hematocrit(Ht) 및 hemoglobin(Hb)치와 이를 근거로 하여 구한 MCV(mean corpuscular volume), MCHC(mean corpuscular hemoglobin concentration), MCH(mean corpuscular hemoglobin)수치를 정리하였다(Table 2).

MCV는 1회 채혈부터 3회 채혈까지 유의하게 상승을 보이다가 5회 채혈 이후부터는 대조군에 비하여 유의하게 감소하였다. MCH는 7회 채혈 이후 유의한 감소의 경향을 보였다. 한편, MCHC는 7회 채혈까지 유의차는 인정되지 않았으나, 7회 채혈 이후 유의하게 감소했다.

MCV, MCHC 및 MCH의 수치가 8회 채혈 시 유의한 감소함에 따라 소구성 저혈색소성 빈혈(microcytic hypochromic anemia)로 이어졌다.

(2) 혈구 형태의 변화

채혈 전의 개체에서 평균 0.8%의 유약 적혈구가 출현하였다(Table 3). 정상 적혈구는 타원형의 세포 형태와 호산성 세포질을 가지고 있었다(Fig. 3-1).

1회 채혈 이후 young erythroblast의 출현률이 다소 증가했으며, 세포의 형태는 성숙 적혈구와 같은 타원형이나, 크기는 크며 성숙적혈구보다 세포질이 옅은 호산성을 띠었다(Fig 3-2). 2회 채혈 이후부터는 대량의 호염성 유약 적혈구 수가 급격하게 증가하였다. 그 세포의 형태는 타원형이나, 채혈 횟수가 많아질수록 세포질의 염색성이 옅어지거나 거의 염색성을 띠지 않고 있었으며 그 세포의 형태도 타원형에서 원형으로 다양하게 출현하였다. 게다가 성숙적혈구 세포질의 호산성 염색성도 저하되었다. 5회 채혈 이후 약 85%의 미성숙 적혈구가 관찰되었다(Table 3). 2회 채혈 이후부터 핵 분열이 이루어지지 않은 아령모양(dumbbell-shaped)형태로 관찰되는 이상적혈구가 출현하기 시작했다. 지속적으로 채혈함에 따라 이상적혈구의 수가 증수하였으며, 그 핵의 형태와 세포질의 염색성도 일정하지 않았다. 8회 채혈 시에서는 정상적인 핵 형태나 염색성을 가진 적혈구는 거의 관찰할 수 없었다(Fig. 3-4).

(3) 혈액 생화학적 파라메타의 변화

채혈 전에 총 30마리의 틸라피아에서 측정된 총 단백질, ALT와 AST의 평균은 각각 2.9g/dl, 7.8 μ /l, 15.8 μ /l로 나타났다(Table 4). 이후 계속적인 반복 채혈로 인해 8회 채혈까지 총 단백질이 1.6g/dl로 유의하게 감소하였다. 한편 ALT와 AST치는 8회 채혈 시에는 11.7 μ /l, 30.5 μ /l로 분석되었으며, AST치의 유의한 증가가 관찰되었다. 전체적으로 32일 동안 반복채혈에 따른 증가 변화는 보이지 않았다. 대조군 A와 32일 동안의 절식 대조군 B사이에 있어서도 유의한 변화는 인정되지 않았다.

Table 2. Change of various hematological parameters after repeated bleedings.

Bleeding times	Ht (%)	Hb (g/dl)	RBC count ($10^4/\text{mm}^3$)	MCHC (%)	MCV (μm^3)	MCH (pg)
control A (n=30)	26.5 $\pm$ 3.4	8.8 $\pm$ 1.2	233 $\pm$ 24	32.4 $\pm$ 2.1	116.2 $\pm$ 13.8	39.8 $\pm$ 5.4
1st (n=25)	15.8 $\pm$ 2.2*	4.9 $\pm$ 0.6*	144 $\pm$ 22*	31.6 $\pm$ 3.8	124.6 $\pm$ 15.4*	39.5 $\pm$ 10.0
2nd (n=20)	10.6 $\pm$ 2.3*	4.8 $\pm$ 0.6*	94 $\pm$ 18*	29.3 $\pm$ 4.6	131.8 $\pm$ 21.2*	40.7 $\pm$ 12.4
3rd (n=15)	8.9 $\pm$ 1.2*	3.1 $\pm$ 1.1*	56 $\pm$ 16*	37.4 $\pm$ 7.1	169.6 $\pm$ 26.9*	45.5 $\pm$ 12.8
4th (n=11)	6.8 $\pm$ 1.9*	2.2 $\pm$ 0.51*	48 $\pm$ 14*	34.7 $\pm$ 7.2	142.2 $\pm$ 21.9	44.2 $\pm$ 10.6
5th (n=10)	5.3 $\pm$ 0.9*	1.8 $\pm$ 2.9*	51 $\pm$ 10*	41.2 $\pm$ 13.8	108.2 $\pm$ 37.4*	30.0 $\pm$ 10.6
6th (n=8)	4.6 $\pm$ 1.2*	2.0 $\pm$ 0.66*	44 $\pm$ 31*	35.3 $\pm$ 8.9	82.8 $\pm$ 17.4*	27.7 $\pm$ 7.2
7th (n=5)	3.5 $\pm$ 1.3*	1.6 $\pm$ 0.52*	31 $\pm$ 9*	25.5 $\pm$ 4.9	93.0 $\pm$ 12.3*	23.7 $\pm$ 7.2*
8th (n=3)	2.7 $\pm$ 0.3*	0.9 $\pm$ 0.32*	33 $\pm$ 17*	22.6 $\pm$ 1.1*	70.2 $\pm$ 19.0*	21.4 $\pm$ 7.1*
control B (n=3)	26.0 $\pm$ 0.7	8.3 $\pm$ 0.2	212 $\pm$ 14	32.0 $\pm$ 0.6	121 $\pm$ 3.2	39.9 $\pm$ 0.6

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

* significant difference from control ($P < 0.05$).

Table 3. Mature, immature and dumbbell-shaped RBC counts(%) of Nile tilapia in each bleedings.

Bleeding Times	Erythrocyte count (%)		
	Mature RBC (%)	Immature RBC (%)	Dumbbell-shaped RBC (%)
0	98.6±0.8 (3)	0.8±1.2 (3)	0 (3)
1st	95.6±3.0 (3)	2.2±2.0 (3)	0 (3)
2nd	67.8±13.4 (3)	31.8±13.6 (3)	0.2±0.5 (3)
3rd	48.2±17.0* (3)	51.5±17.1* (3)	0.2±0.2 (3)
4th	31.33±2.0* (3)	68.6±1.9* (3)	0.5±0.8 (3)
5th	15.25±1.5* (3)	84.6±1.4* (3)	0.2±0.1 (3)

(): number of fish.

* significant difference from control (P<0.05).

Table 4. Change in blood chemistry after repeated bleedings.

Bleeding times	TP (g/dl)	ALT (μ /l)	AST (μ /l)
control A	2.9 $\pm$ 0.4 (n-28)	7.7 $\pm$ 5.0 (n-28)	15.8 $\pm$ 9.2 (n-28)
1st	2.4 $\pm$ 0.4* (n-13)	13.8 $\pm$ 5.3* (n-13)	13.9 $\pm$ 5.8* (n-13)
2nd	2.2 $\pm$ 0.4* (n-14)	8.4 $\pm$ 4.4 (n-15)	8.8 $\pm$ 3.4 (n-15)
3rd	2.0 $\pm$ 0.2* (n-14)	7.4 $\pm$ 4.2 (n-14)	11.8 $\pm$ 5.0 (n-14)
4th	2.2 $\pm$ 0.2* (n-11)	15.3 $\pm$ 9.7 (n-11)	18.3 $\pm$ 11.7 (n-11)
5th	1.9 $\pm$ 0.2* (n-8)	10.7 $\pm$ 8.1 (n-8)	10.9 $\pm$ 3.6 (n-8)
6th	1.8 $\pm$ 0.2* (n-8)	13.0 $\pm$ 7.6 (n-8)	24.1 $\pm$ 16.5 (n-8)
7th	1.7 $\pm$ 0.1* (n-5)	16.4 $\pm$ 12 (n-5)	10.1 $\pm$ 5.6 (n-5)
8th	1.6 $\pm$ 0.4* (n-3)	11.7 $\pm$ 4.6 (n-3)	30.5 $\pm$ 8.0* (n-3)
control B	2.6 $\pm$ 0.4 (n-3)	11.3 $\pm$ 3.5 (n-3)	30.9 $\pm$ 14.8 (n-3)

TP: total protein, ALT: alanine transaminase, AST: aspartate transaminase.

* significant difference from control (P<0.05).

4. 병리조직학적 소견

(1) 두신과 비장의 스텐프 표본소견

2가지 조혈 조직의 스텐프 표본에서 다량의 적혈구계 세포들의 출현이 증가하였다. 대조군의 두신에서와 유사하게 PAS 염색 결과 과립구계 세포들은 약 양성이나 양성을 보였으며, 적혈구계 세포, 혈소판, 임파구는 음성 반응을 보였다(Fig.2-1). 두신에서 proerythroblast는 다른 적혈구계 세포에 비해 다소 큰 핵을 가지고 있었으며, 세포질과의 경계가 명확하지 않게 관찰되었다. 또한 그 핵과 세포질은 짙은 호염성을 나타내었다(Fig.2-3). Proerythroblast를 제외한 적혈구계 세포는 세포의 형태가 원형이며, 바렛살 모양의 핵은 뚜렷하게 관찰되었다. 그 핵은 짙은 호염성이나 세포질은 옅은 호염성으로 관찰되었다(Fig. 2-3).

4회 이상 채혈한 일부 개체의 두신 동(sinus)내에 분포한 세망내피계 세포에 의한 적혈구 탐식 상이 관찰되었다(Fig.4-3). 세망내피계 세포 내에 핵과 세포질의 모습에 비추어 적혈구 잔재임이 확인되었으며, PAS에 약 양성을 띠며 멜라닌 과립이 확인되기도 하였다. 또한 심한 빈혈 개체의 말초 혈액에서 관찰되는 아령모양(dumbbell-shaped) 적혈구와 핵의 형태가 비정상적인 적혈구도 두신에서 관찰되었다(Fig. 2-4).

4회 채혈 이후 비장에서도 적혈구계 세포들의 증수가 관찰이 되었으며, 7회 이상 채혈한 개체의 비장은 대부분 호염기성을 띠는 유약 적혈구로 가득 차 있었다(Fig. 2-2).

(2) 장기 및 조직의 광학현미경적 소견

각 회 채혈 후 4일 마다 3 마리씩으로부터 빈혈 개체의 모든 장기 및 조직에 대한 광학 현미경 표본을 제작하여 검경하였다. 대조군의 정상 두신은 대부분 성숙 및 유약 혈구, 세망세포, 세망섬유, 대식세포 등으로 이루어진 실질영역과 이들 사이에 맥관계 주변의 기질 영역이 균질하게 배열되어 있었으며, 비교적 이와 밀접하여 소수의 MMC를 형성하고 있었다(Fig. 4-1). 3회 이상 채혈한 개체의 두신에서는 핵이 크고 짙은 호염성의 세포들의 많은 출현에 따른 조혈 활성의 증가 소견이 관찰되었으며, 유사 분열 중인 조혈세포도 다수 관찰되었다(Fig. 4-2). 핵이 크고 짙은 호염성의 세포들은 혈관 주위로 집단을 이루거나 실질 영역에 흩어져 집단으로 관찰되었으며, 혈관 통과 중의 유약 적혈구들이 많이 관찰되었다. 또한 적혈구를 탐식한 대식 세포들이 두신의 동(sinu)에서 확인되었다(Fig. 4-4).

대조군의 비장은 비수의 부분이 포유류처럼 명확하지 않지만 주로 적혈구를 함유하는 적색수(red pulp)와 림프구로 구성되는 백색수(white pulp)가 비장 전반에 걸쳐 섞여 나타나는 전형적인 정상 경골어류의 조직 소견을 나타내었다. 또한 모세혈관은 혈관내피와 바깥으로 포식기능을 수행하는 협조직(ellipsoid)은 길쭉하거나 둥근 형태로 관찰되며, 이 혈관은 비장 조직 전역에 골고루 분포하고 있었다(Fig. 5-1). 채혈에 따른 빈혈 개체에서는 황갈색의 색소를 함유한 비교적 소형의 MMC들이 관찰되었다(Fig. 5-2). 또한 비장의 적색수(red pulp)가 호염성의 적혈구계 세포 등의 증가에 따른 호염성 영역으로 관찰되었으며, 협조직의 비후가 관찰되었다(Fig. 5-3).

대조군, 4회, 7회 및 8회 채혈 이후의 두신과 비장에 대한 prussian blue 반응에서 대조군과 4회 채혈한 빈혈 개체의 비장의 MMC내에는 약한 양성반응이

관찰되었으나(Fig. 6-1), 두신에서는 음성 반응을 보였다(Fig. 6-2). 7회와 8회 채혈한 개체에서는 비장의 MMC내에서 강한 양성 반응을 보였으며(Fig. 6-3), 두신의 MMC와 동(sinus)주위에서는 국소 양성 반응을 보였다(Fig. 6-4).

간장의 중심정맥 주변으로 3회 채혈 이후부터 국소 지방 변성의 소견이 관찰되었고, 7회 채혈 이후에는 간장에 전반적으로 관찰되었다(Fig.7-1).

틸라피아는 담수열대어종으로서 신장의 네프론(nephron)이 잘 발달되어 있었으며, 조혈조직으로 구성된 간질(interstitium)이 거의 관찰되지 않았다. 빈혈 개체의 체신에서 신세뇨관과 사구체에서의 유의할 만한 조직학적 변화는 관찰되지 않았다.

5회 이상 채혈한 개체의 위에서 부종과 위선부의 확장 소견이 관찰되었다(Fig7-2). 또한 7회 채혈 이후 심장의 심실, 동맥구 및 뇌의 외막에 경미한 부종이 관찰되었으며, 8회 채혈한 개체에서는 현저한 반응이 나타났다(Fig.7-3, Fig.7-4). 간장과 심장에서 수외조혈(extramedullary hemopoiesis)은 관찰되지 않았다.

IV. 고 찰

어류의 빈혈은 각종 질병적 상황에서 발생하며 심한 경우 육안적으로는 아가미가 창백해 보이기 때문에 쉽게 인지 가능하다. 빈혈이 어체에 어떠한 영향을 미치는지에 대한 상세한 연구는 거의 없다. 본 연구에서는 채혈을 통하여 인위적으로 극단적인 출혈성 빈혈을 유도하여 그 영향을 관찰하고자 하였다.

어류에 있어서 출혈성 빈혈은 흔하지는 않지만, 거머리(leeches) 또는 칠성장어(lampreys)같은 체외 기생은 많은 량의 혈액 소실을 일으키며 무지개 송어의 바이러스 출혈성 패혈증(viral hemorrhagic septicemia), spring viremia of carp 및 channel catfish virus 질병이 출혈성 빈혈을 야기하는 것으로 알려져 있다 (Ferguson, 1989). 바이러스 출혈성 패혈증에 감염된 무지개 송어의 Ht치와 Hb 양이 43%와 10g/dl에서 12%와 4g/dl로 감소하였으며, 말초 혈액 내에서 많은 미성숙 적혈구를 관찰하였음을 보고하였다(Amlacher *et al.*, 1980; Wolf, 1988).

32일 동안 체중의 1%를 매 4일 간격으로 반복 채혈함으로써 Ht치가 2.8%로 낮아져 심도의 빈혈이 유도되었다. 첫 회 채혈 4일 후 Ht치가 평균 약 16%에서 시작하여 8회 채혈시 약 3%의 범위에서 약 32일간 만성빈혈 상태에 있었다. 어류의 혈액량은 어종이나 보고에 따라 일정하지 않으나, 체중의 약 2~8%내에 든다(Fänge, 1994). 틸라피아의 경우 그 혈액량이 알려져 있지 않다. 따라서 본 연구에서 체중의 약 2%를 전 혈로 가정하여 채혈량을 결정하였다. 어체에 대한 빈혈의 영향을 극대화하기 위하여 Schidler와 Vries(1986)의 기준을 따랐다. 이들은 체중의 약 1%의 단 회 채혈은 24시간 내에 적혈구 수를 대조의 약 39%로 감소시켰다고 보고하였다. 또한 채혈 후 미성숙 적혈구 및 백혈구가 출현하기

시작하고, 대량의 미성숙 적혈구가 출현에는 채혈 후 10~12일 걸린다고 하였다. 따라서 본 연구에서 4일 째 빈혈에 대한 보상반응으로서 미성숙 적혈구 및 백혈구가 출현한 시점인 4일 째에 2회 채혈을 실시하였고, 2회 이후의 채혈도 4일 간격으로 실시하였다.

틸라피아 빈혈 개체의 외부증상에서는 창백한 아가미와 5회 채혈 이후 국소 비늘 탈락이 관찰되었다. 특히 흥미로운 것은 비늘 탈락 현상으로, 지금까지 빈혈과 관련하여 기술된 적은 없다. 빈혈은 전신조직에 저산소증(hypoxia)을 야기할 것이고, 산소에 민감한 조직은 기능 저하 내지 손상이 예상된다. 비늘은 진피 유래의 조직으로 진피 내지 피하의 혈관에 의하여 산소 공급을 받는 것으로 알려져 있다(Hibiya, 1982). 어류의 피하 조직 내 혈류량은 많은 것으로 알려져 있고, 그 탈락 현상은 피하 혈관의 산소 분압의 저하와 관련 지을 수 있다.

어류의 정상 적혈구 및 그 형태에 관한 많은 연구가 이루어져 있다 (Lopez-Ruiz *et al.*, 1992; Fischer *et al.*, 1998; Fijan, 2002). 틸라피아 말초의 정상 혈액 내 적혈구는 성숙적혈구 외에는 미성숙 적혈구가 관찰되었고, 약 0.8%는 미성숙 적혈구에 해당하였다. 이 미성숙적혈구는 광학현미경상으로 성숙 적혈구와 유사한 타원형의 형태이나 다소 크며, 세포질은 옅은 호산성을 띠었다. 어류의 적혈구는 형태학적으로 그 발달 단계에 따라 proerythroblast, basophilic erythroblast, polychromatic erythroblast, orthochromic erythroblast, young erythroblast 및 old erythrocyte로 나뉘지므로, 사람이나 고등동물의 것과 큰 차이가 없어 보인다. 말초에서 관찰될 수 있는 단계의 적혈구는 orthochromic erythroblast 이후 것으로 알려져 있다(Fijan, 2002). 이 기준에 따라 정상 적혈구 내 미성숙 적혈구는 young erythrocyte에 해당하는 것으로 인

정되었다. 3회 채혈 후의 결과까지 MCV가 증가하였다. 이는 young erythrocyte가 성숙 적혈구의 110%에 이를 수 있는 체적에 기인한 것으로 사료된다(Fijan, 2002).

채혈 횟수가 많아짐에 따라 말초 혈액에서 다양한 종류의 미성숙 적혈구와 이상 적혈구의 출현수가 지속적으로 증가했으며, 7회 이상 채혈한 개체에서는 정상적인 염색성과 형태를 가진 적혈구를 거의 관찰할 수 없었다. 고등동물의 경우 말초혈액에서 불규칙한 이상적혈구가 많이 출현하면 변형적혈구 증가증(poikilocytosis)라 하며(Jones and Hunt, 1983), 어류의 말초 혈액에서 성숙 적혈구의 염색성 소실, 유약 적혈구의 형태이상 및 세포질의 염색소 소실은 다른 어종의 빈혈에서 보고되어있다(Horton and Okamura, 2003; Nakayasu *et al.*, 2002). 이상 적혈구는 전자현미경 상으로 불충분한 hemoglobin 축적을 나타내었다(Nakayasu *et al.*, 2002). 특히 본 실험 빈혈 개체에서 관찰되는 아령모양(dumbbell-shaped)의 적혈구는 고등동물의 빈혈 시에도 관찰되었고, 이상 적혈구로 간주하고 있다(Datta, 1990). 아령모양(dumbbell-shaped) 적혈구는 건강한 어류에서도 bilobed cell로서 보고되었으며, 사료의 영양소 결핍, 빈혈 또는 스트레스 상황에 관련된다고 하였다(Noyes *et al.*, 1991; Duncan *et al.*, 1993; Murad *et al.*, 1993; Houston and Murad, 1995). 이와 같은 적혈구는 분열 중의 세포로서 엽산 결핍으로 인한 DNA의 합성 장애에 의해 정확한 분열이 일어나지 않은 채 말초 혈액으로 방출되었다고 추측하거나 짧은 기간 동안 혈액의 산소 운반 능력을 상승시키는 역할을 하는 것으로 추측하였다(Houston and Murad, 1995; Butterworth *et al.*, 1986). 본 연구에서 빈혈 개체의 아령모양(dumbbell-shaped) 적혈구는 정상 적혈구와 같은 세포질의 염색이 거의 없었으므로, 정상 헤모글로빈이 결핍된 것으로 여겨져, 산소 운반능력의 상승과 관련

이 없는 것으로 생각되었다. 7회 채혈 이후 이상 적혈구가 대부분인 5%이하 Ht치는 산소 운반과 관련하여 의미가 거의 없는 것으로 생각된다.

본 연구에서 전혈의 약 50%에 해당하는 혈액을 채혈하였음에도 불구하고, 채혈 후 곧바로 폐사하거나 호흡곤란과 같은 빈혈에 따른 임상소견이 없었다. 사람에게 있어서 30%이상 대량으로 혈액이 소실된다면, 순환 혈량 감소에 따른 쇼크가 일어나거나 생명이 위태롭게 된다고 한다(Hillman, 1978). 경골어류는 Hb이 없거나 기능적 부재상태에서도 생존 능력이 있다고는 보고가 있다(Anthony, 1961). 고등동물의 경우에 출혈성 빈혈에 대한 보상 기전이 작동하는데 즉 심박동 수와 혈액 박출량 증가, 세동맥 확장 및 순환속도 증가로 조직의 관류량이 증가한다. 또한 적혈구수의 증가로 순환 혈액량의 혈액 점성이 증가하여 혈전형성과 혈압 상승을 유발한다고 되어있다(Cotran *et al.*, 1999). 담수에서 무지개송어의 Ht치가 70% 감소된 상태에서 심장 박출량을 증가시킴으로써 아가미를 통해 줄어든 산소 운반 혈액량을 증가시키고 말초 혈관계 저항을 감소시킴으로써 산소를 조직에 정상적으로 공급한다는 보고가 있다(Cameron and Davis, 1970). 또한 Ht치가 5%이하일 경우, 대부분의 주요 보상 기전이 불완전하여 죽음으로 이어진다고 하였다(Wood *et al.*, 1979). 그러나 본 연구에서 Ht치가 5%이하에서 12일 동안 폐사하지 않았을 뿐 아니라, 비늘 탈락이외에 외부 증상이나 소견이 관찰되지 않았다. 따라서 빈혈과 폐사에 관한 연구는 더욱 이루어져야 할 것으로 생각된다.

고등동물에서 만성 출혈성 빈혈 시 소구성 저색소성(microcytic hypochromic) 빈혈이 나타나며, 철 결핍성 빈혈이 유도된다(Jones and Hunt, 1983). 본 실험에서 빈혈어에서도 8회 채혈 이후부터 MCV와 MCH 수치가 감소하여 즉 적혈

구의 크기 감소와 동시에 적혈구 내 Hb양도 감소하는 소구성 저색소성 (microcytic hypochromic) 빈혈이 유도되었다. 따라서 텔라피아에서도 채혈에 따른 철 성분의 고갈이 빈혈 유형에 영향을 준 것으로 사료되었다.

고등동물에서 극심한 빈혈 시 간장은 지방 변성과 함께 괴사가 동반된다고 알려져 있다(Cotran *et al.*, 1999). 저 산소는 세포의 손상을 일으키고 미토콘드리아의 기능 이상을 야기 시키는데, 이로 인해 지방산의 산화와 이용이 감소하여 triglycerides가 간세포 내에 축적된 것이다(Jones and Hunt, 1983). 이 지방 변성은 산소 분압이 낮은 중심정맥을 중심으로 일어나는 것으로 알려져 있다. 본 실험의 빈혈어에서는 지방변성 소견이 고등동물과 유사하게 중심정맥 중심으로 관찰되었다. 그러나 괴사 소견은 관찰되지 않았다. 8회 채혈 결과에서만 유의한 변화가 관찰되었으나, 전체적으로 혈액 생화학 결과에서 간 손상 지표인 ALT나 AST에 있어서 유의한 변화가 인정되지 않았다.

고등동물에 있어서 빈혈 시 조직에 충분한 산소 공급이 되지 않아 심근의 지방 변성과 급성신부전이 쉽게 오며, 또한 신세뇨관 상피 괴사가 나타난다(Cotran *et al.*, 1999). 본 실험에서는 7회 이상 채혈한 심실, 동맥구 및 뇌 외막에서 부종이 생성되었지만, 괴사와 관련한 병리조직학적 변화는 관찰되지 않았다. 산소공급은 관상동맥에 의할 뿐만 아니라 어류의 심장은 spongy층이 발달하여 심내강의 혈액으로부터 직접 산소를 취하는 것으로 되어있다. 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). 하나는 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 고등 포유류에서는 사구체의 혈액 흐름이 차단될 경우나 빈혈의 경우, 신세뇨관의 손상이 야기되기 쉽다.

다른 어종(Lane, 1980; Schindler and Vries, 1986; Houston and Murad, 1995)에서 보고 된 바와 같이 혈액 소실로 인한 텔라피아의 적혈구 형성은 조혈기관의 적혈구계의 증수로 나타났다. 5회 채혈 이후 이상적혈구가 말초 혈액에서 많이 관찰되며, 일부 두신 조직 및 스템프 표본에서 관찰되는 세망내피계 세포의 적혈구 포식상이 관찰되었다. 이것은 이미 고등동물을 대상으로 한 용혈성 실험에서 보고하였다(Sorrell, 1982; Datta, 1989). 어류에 pheyldrazine을 근육주사 하였을 때, 주로 비장, 간장 및 골수에서 세망내피계 세포의 의한 파괴된 적혈구나 이상 적혈구의 포식상이 관찰되었다. 어류와 달리 Kuffer cells의 포식 작용이 간장에서 뚜렷하게 관찰되었다고 한다. 본 실험에서 5회 채혈 이후부터 조혈 조직의 MMC내 hemosiderin이 증가한 것으로 미루어보아 포식상은 이상 적혈구가 포식된 것으로 사료된다.

고등동물에서 출혈성 빈혈 시 조혈조직 이외 간장과 심장에서 수외조혈(extramedullary hemopoiesis)이 나타나는 것으로 보고하였다(Redondo *et al.*, 1995). 그러나 텔라피아의 경우 빈혈개체 비장의 적색수(red plup)가 대부분이 proerythroblast를 포함한 적혈구계 세포로 구성되어 있는 점을 미루어보아 조혈활성이 증가됨을 알 수 있었으나, 수외조혈(extramedullary hemopoiesis)은 관찰되지 않았다.

본 연구 결과를 종합해 볼 때, 빈혈의 유형은 고등척추동물과 차이가 없으나,

적혈구의 형태학적 소견의 추이와 병리조직학적 영향에 있어서는 많은 차이를 보이는 것으로 생각된다. 따라서 포유류의 일반적인 빈혈 영향으로 어류의 빈혈을 이해하는데 차이점이 있다. 또한 이와 같은 극단적인 출혈성 빈혈의 모델과 임상 증상은 각종 질병의 중요한 병리학적 정보로 활용 가능할 것으로 사료되며, 극단적인 빈혈에서 회복이 어류의 각 조직에서 어떠한 변화로 나타날 것인지에 대한 연구가 지속되어야 한다.

V. 요 약

어류의 빈혈에 의한 병리학적 영향을 알기 위한 목적의 하나로 틸라피아에 대한 반복 채혈을 통해 극단적인 빈혈을 유도하여 혈액학적 방법과 병리조직학적 방법을 통해 조사하였다. 총 32일 동안 4일 마다 어체중 약 1%에 해당하는 혈액을 8회에 걸쳐 미정맥(caudal vein)으로 반복채혈 하여 출혈성 빈혈을 유도하였으며, 빈혈 유형은 소구성 저혈색소성 빈혈(microcytic hypochromic anemia)로 나타났다. 혈액 생화학 분석에서 total protein 수치에서 유의한 감소가 나타났으나, ALT(alanine transaminase)나 AST(aspartate transaminase) 수치에는 유의한 변화가 인정되지 않았다. 외부소견에서 아가미의 빈혈성 퇴색, 국소 비늘의 탈락, 조혈조직의 간색조 및 간장의 빈혈성 퇴색이 확인되었다. 미성숙 적혈구의 출현률은 3회 채혈 이후 유의하게 상승했으며, 아령모양(dumbbell-shaped) 적혈구는 2회 채혈부터 출현하기 시작하여 이후 지속적으로 관찰되었다. 병리조직학적으로는 간장의 중심정맥 중심의 지방변성이 관찰되었다. 두신과 비장에서는 적혈구계 세포의 증수가 보였으며, 일부 두신에서 또한 유동 내 세망내피계 세포의 미성숙 적혈구 탐식상이 관찰되었다. 7회 채혈 이후 이러한 병리조직학적인 변화는 현저하였으며, 심장 및 뇌의 외막에서 부종 소견과 위선부의 확장 소견이 관찰되었다. 이상의 실험적 출혈성 빈혈 개체에 대한 혈액학적 및 병리조직학적 소견에 미루어 빈혈의 유형은 고등척추동물과 차이가 없으나, 빈혈의 병리조직학적 영향에 있어서는 많은 차이를 보이는 것으로 사료된다.

표제어: 틸라피아 · *Oreochromis niloticus* · 출혈성 빈혈 · 소구성 저혈색소성 빈혈

VI. 결과그림 및 그림설명

Fig. 1. External and internal findings of a severely anemic Nile tilapia

Fig. 1-1. A Nile tilapia after the 6th bleeding. Note pale gill, light brown liver, pale hemopoietic tissues. G: pale gill, L: light brown liver, H: hemopoietic tissue.

Fig. 1-2. A Nile tilapia after the 6th bleeding showing local loss of scales(circle).

Fig. 1.

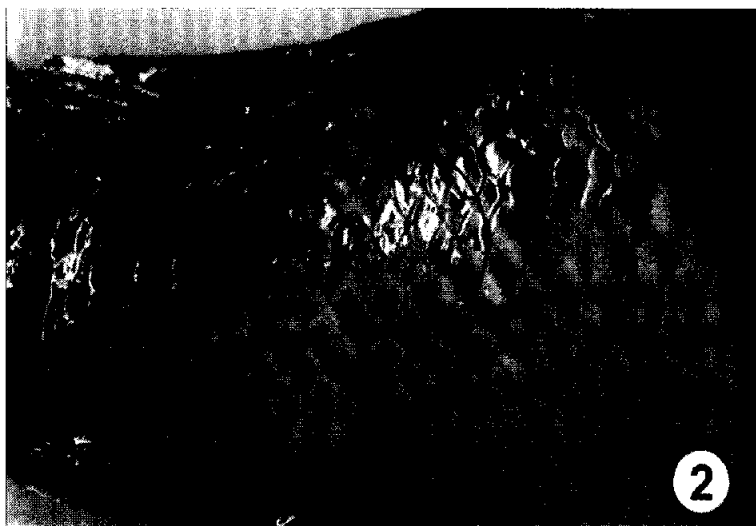


Fig. 2. Impressions of head kidney and spleen in severely anemic individuals.

Fig. 2-1. Increased erythrocytic cell series in head kidney after the 8th bleeding. PAS, $\times 1000$.

Fig. 2-2 Increased erythrocytic cell series in spleen after the 8th bleeding. PAS, $\times 1000$.

Fig. 2-3. Marked increase of proerythrocytoblast (arrow) in head kidney after the 8th bleeding. PAS, $\times 1000$.

Fig. 2-4. Marked increase of proerythrocytoblast (arrow) in spleen after the 8th bleeding. PAS, $\times 1000$.

Fig. 2.

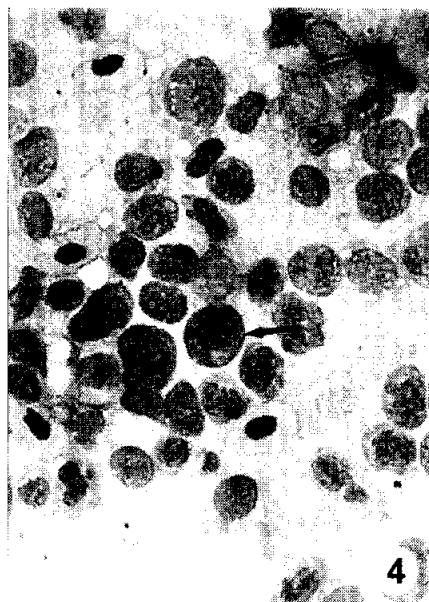
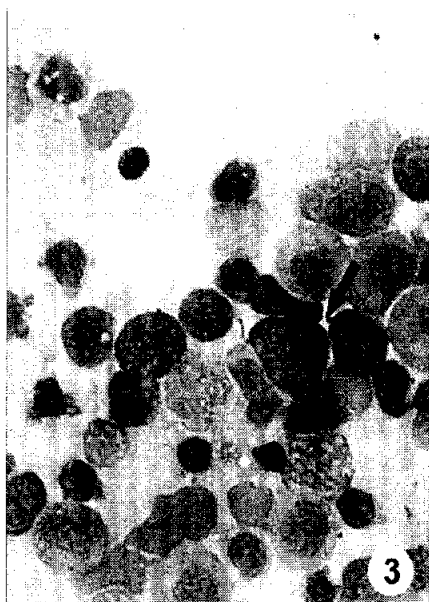


Fig. 3. Peripheral blood from control and severely anemic individuals.

Fig. 3-1. Peripheral blood from control individual. A large number of mature erythrocytes. Diff-Quik stain, $\times 400$.

Fig. 3-2. Peripheral blood after the 1st bleeding. Note a few young erythrocytes, Arrow: young erythrocyte. Diff-Quik stain, $\times 1000$.

Fig. 3-3. Peripheral blood after the 4th bleeding. The increase of immature erythrocytes and appearance of abnormal erythrocytes. Arrow: immature erythrocyte, Arrow head: dumbbell-shaped erythrocyte. Diff-Quik stain, $\times 400$.

Fig. 3-4. Peripheral blood after the 8th bleeding. Note increased number of abnormal erythrocytes and a few of normal erythrocytes. Arrow: abnormal erythrocyte, Arrow head: dumbbell-shaped erythrocyte. Diff-Quik stain, $\times 400$.

Fig. 3.

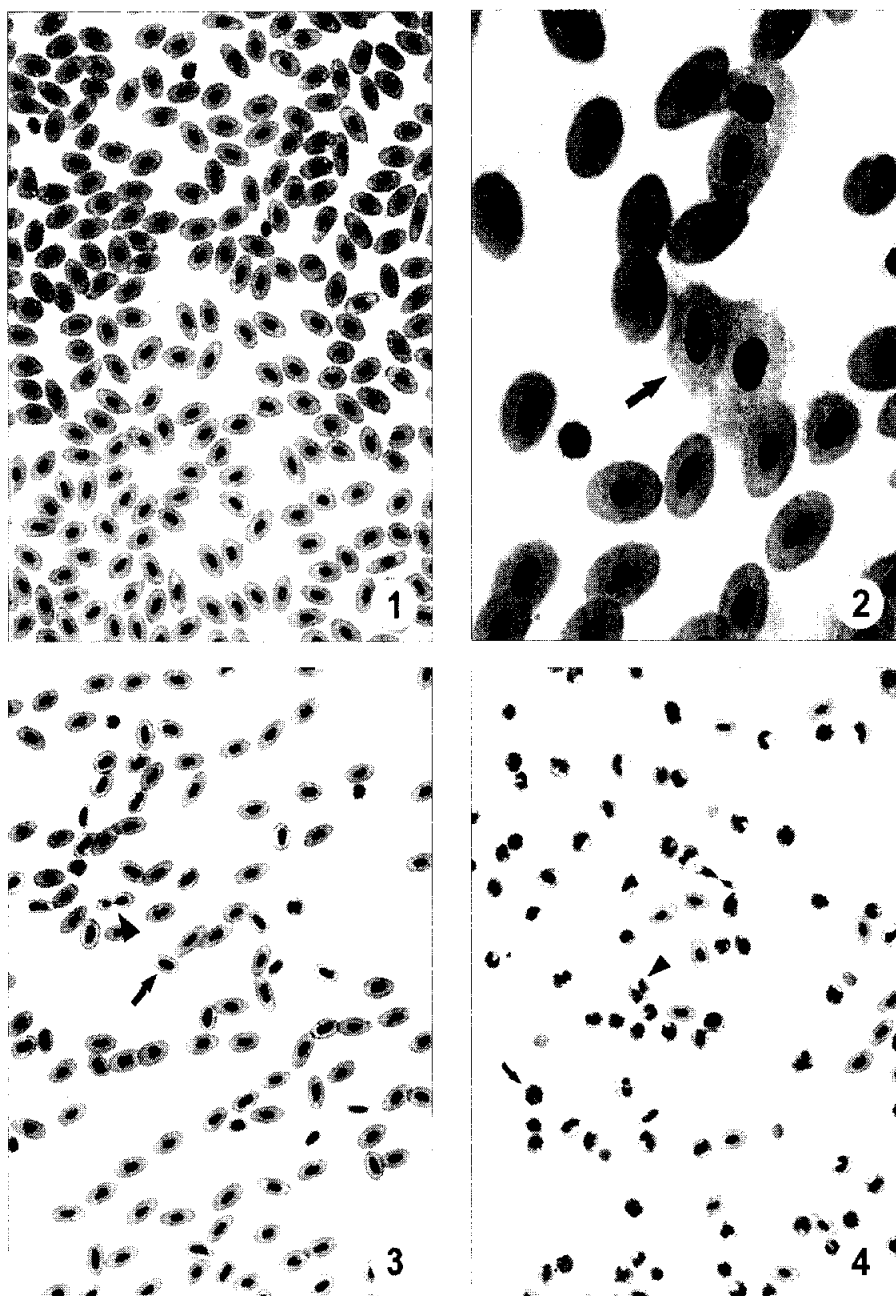


Fig. 4. The histological features of head kidney from control and severely anemic individuals.

Fig. 4-1. Head kidney from control individual. H&E stain, $\times 400$.

Fig. 4-2. Head kidney after the 5th bleeding. Note increased erythropoiesis of head kidney, $\times 400$.

Fig. 4-3. Impression of head kidney after the 4th bleeding. Note the macrophage engulfing many erythrocytes. Arrow: macrophage engulfing many erythrocytes. Diff-Quik. stain, $\times 1000$.

Fig. 4-4. Macrophages engulfing erythrocytes in sinus of head kidney after the 4th bleeding. Arrow: macrophage engulfing many erythrocytes. H&E stain, $\times 400$.

Fig. 4.

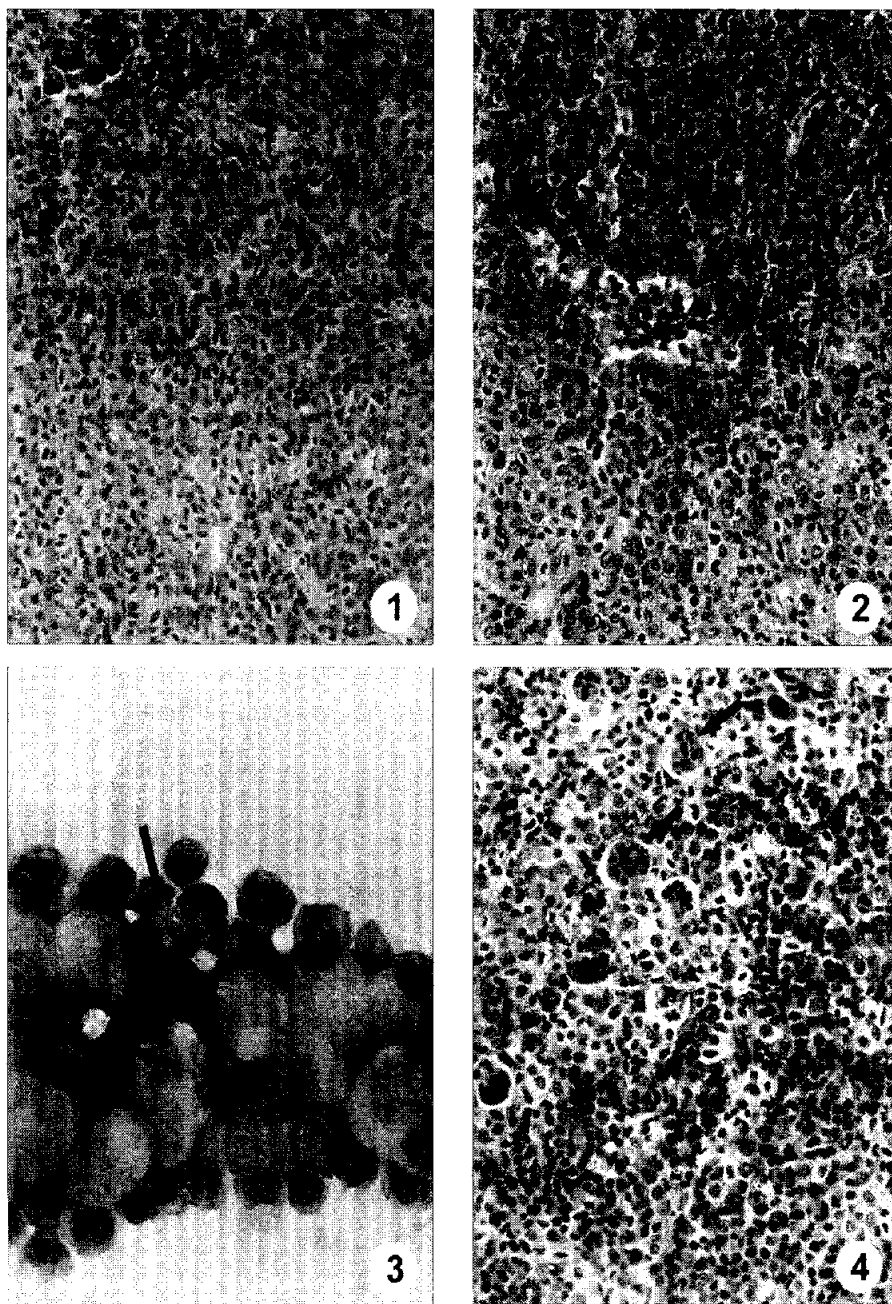


Fig. 5. The histological features of spleen from control and severely anemic individuals.

Fig. 5-1. Spleen from control individual. H&E stain, $\times 400$.

Fig. 5-2. Spleen after the 5th bleeding. Note increased erythropoiesis and MMC of spleen. H&E stain, $\times 200$.

Fig. 5-3. Spleen after the 7th bleeding. Note activated ellipsoid capillary in spleen. H&E stain, $\times 400$.

Fig. 5.

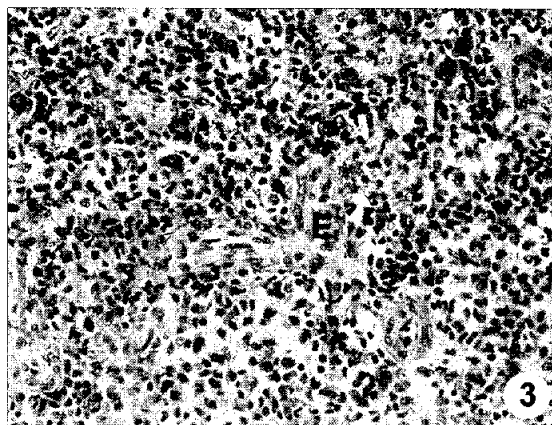
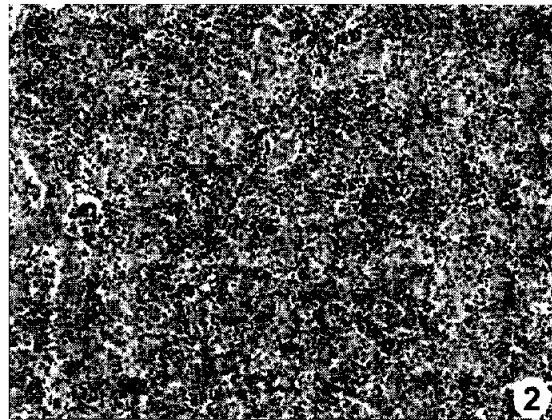
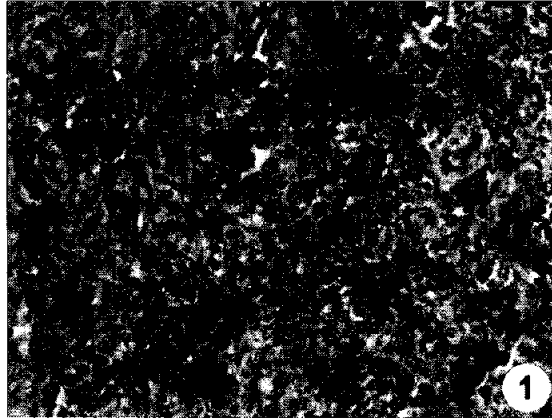


Fig. 6. The histological features of spleen and head kidney from severely anemic individuals. Prussian blue reaction.

Fig. 6-1. Spleen after the 3th bleeding. Note a small amount of hemosiderin in MMC in ellipsoid and parenchyma. $\times 400$.

Fig. 6-2. Head kidney after the 3th bleeding. Note a small amount of hemosiderin in MMC in parenchyma. Circle : MMC. $\times 200$.

Fig. 6-3. Spleen after the 8th bleeding. Note a large amount of quantity hemosiderin in MMC in ellipsoid and parenchyma. $\times 200$.

Fig. 6-4. Head kidney after the 8th bleeding. Note a small amount of hemosiderin in MMC in parenchyma. $\times 200$.

Fig. 6.

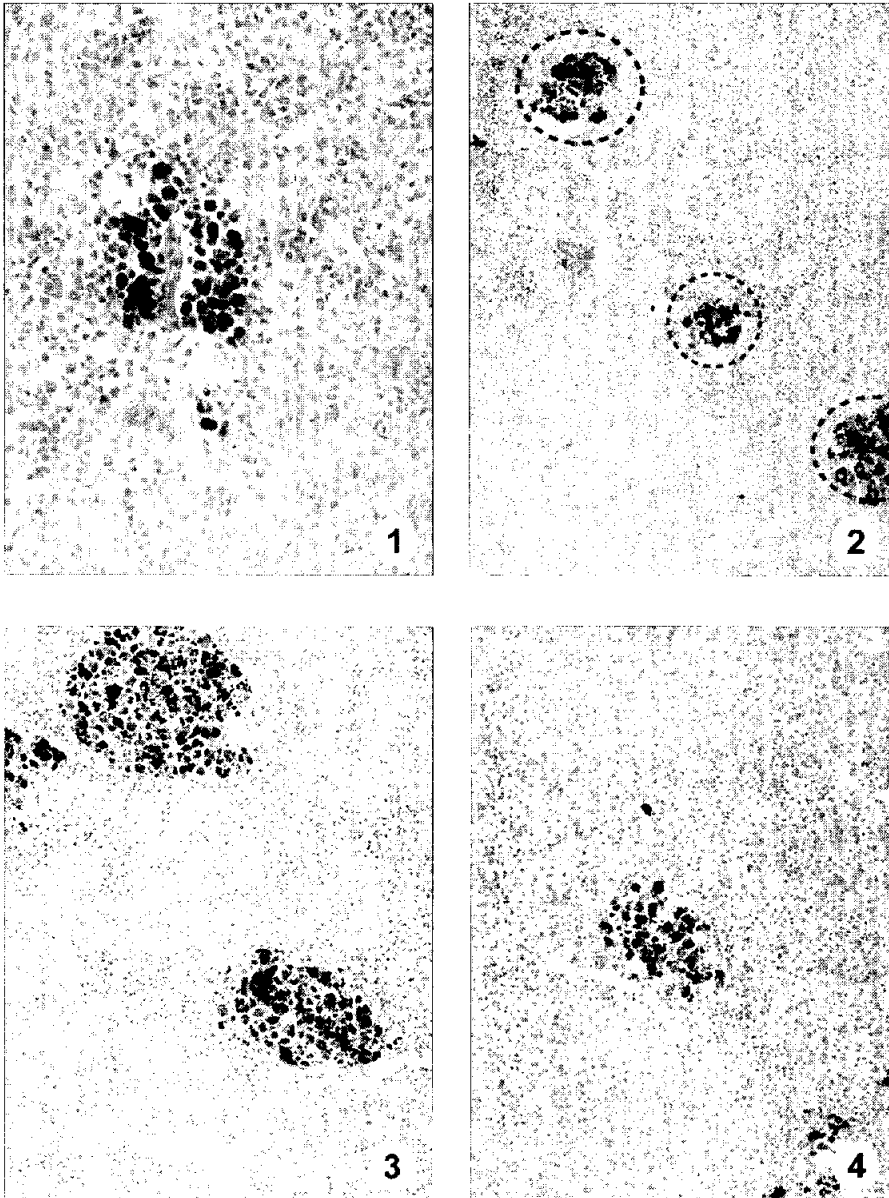


Fig. 7. The histological features of liver, stomach, heart and brain from severely anemic individuals.

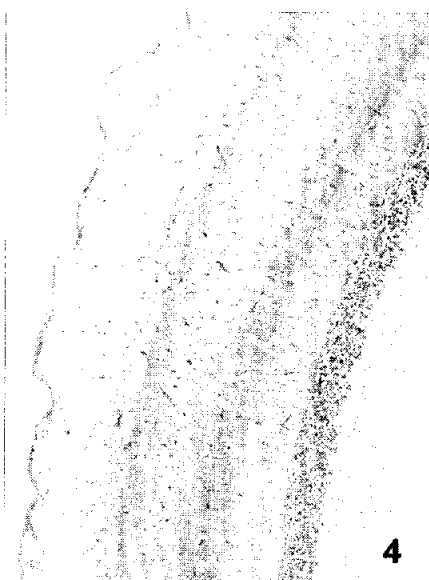
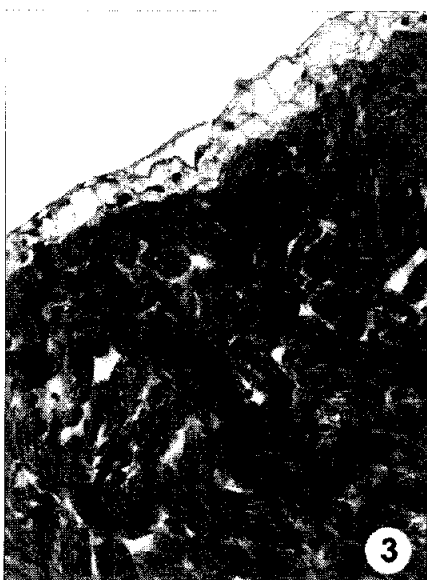
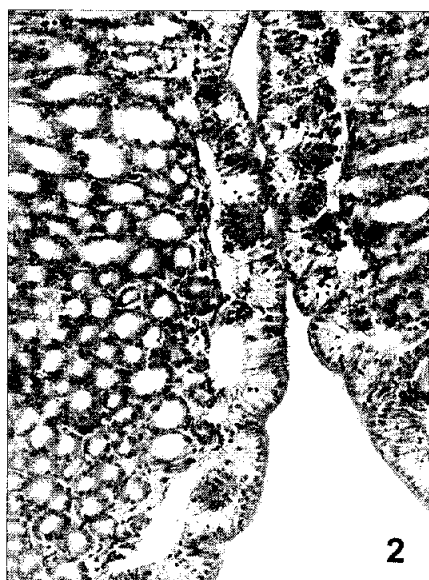
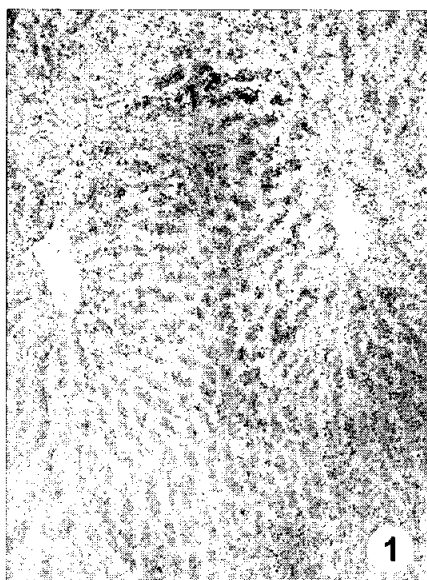
Fig. 7-1. Liver after the 7th bleeding. Note fatty change of liver around central veins. CV: central vein. H&E stain, $\times 200$.

Fig. 7-2. Stomach after the 6th bleeding. Note the focal dilation of gastric glandular tubules and edematous swelling under the lamina propria. H&E stain, $\times 200$.

Fig. 7-3. Heart after the 8th bleeding. Note edematous swelling of epicardium. H&E stain, $\times 200$.

Fig. 7-4. Brain after the 8th bleeding. Note edematous swelling of meninges. H&E stain, $\times 200$.

Fig. 7.



VII. 감사의 글

대학원 생활과 이 논문이 완성되기까지 많은 분들의 도움과 격려로 이 자리에 올 수 있었다고 생각하여 고마운 분들께 감사의 마음을 전하고자 이 글을 적어 봅니다. 부족한 제자를 옆에서 도와주시고 격려해 주신 허민도 교수님께 진심으로 감사드리며, 항상 어병에 관심을 가지고 공부하는 모습으로 보답하겠습니다. 바쁘신 와중에도 제 논문이 완성되기까지 논문지도와 관심을 가져주신 정준기 교수님, 정현도 교수님께 감사드립니다. 어병을 전공하는 동안 많은 가르침을 주신 박수일 교수님, 강주찬 교수님, 김기홍 교수님께 진심으로 감사드립니다.

제 논문 준비에 같이 밤샘 작업까지 마다하지 않으시면서 많은 도움과 격려를 주신 이무근 선배님께 깊은 감사를 드리며 앞으로 박사과정동안 좋은 결과를 얻으시길 바랍니다. 저의 실험과 실험실 생활에 많은 조언과 관심을 가져주신 조병렬 선배님, 이남실 선배님, 강재연 선배님, 최희정 선배님, 류갑민 선배님, 강효주 선배님께 감사의 말씀을 전합니다. 그리고 모르는 것이 있을 때마다 전화로 많은 도움주신 강형길 선배님께도 감사드립니다. 그리고 빈혈에 관한 실험을 시작할 때 옆에서 동기가 되어주며 힘들 때 같이 버텨준 송나영 후배와 항상 실험실 생활을 열심히 하면서 저의 실험에 많은 관심과 도움을 준 최혜정, 오주희, 서지연, 김현지, 정숙진 후배에게도 감사의 말을 전합니다.

실험어 운반과 병리학 실험실의 힘든 일에 많은 도움을 주셨던 이상환 선배님과 박대국 선배님께도 감사드립니다. 대학 동기인 정소정과 전여진에게도 감사하며, 실험 때문에 바쁘다는 핑계로 자주 못 만나면서도 힘들 때마다 좋은 벗이 되어준 손자영, 정영옥, 이수인, 이정아 친구에게도 감사의 마음을 전합니다.

논문 쓰면서 힘들 때마다 언제나 따뜻하게 위로해주거나 엄한 충고를 아끼지 않았던 김병남 친구에게 깊은 감사를 드리며 앞으로 좋은 일만 가득하시길 바라며 삼성전자의 훌륭한 인재가 되시길 바랍니다. 큰딸의 일에는 정신적으로나 물질적으로 든든한 후원자가 되어주신 부모님과 큰손녀를 더욱 사랑하시는 할아버지께 논문 준비로 소홀했던 부분을 이 논문으로나 보답하려고 합니다. 그리고 사랑하는 큰 고모와 작은 고모에게 감사의 마음을 전합니다. 무엇보다 물심양면으로 바쁜 언니를 챙겨준 향진이와 남동생 상훈이에게도 감사의 마음을 전합니다. 이 논문을 완성이로 5년간의 실험실 생활을 마무리하려니 아쉽고 후회되는 일이 많지만, 실험실 생활과 논문을 준비하면서 배웠던 모든 것은 제의 앞길에 많은 도움을 줄 것으로 생각합니다.

Ⅶ. 참 고 문 헌

- Anthony EH (1961) Survival of goldfish in presence of carbon monoxide. J Exp Biol 38: 109-125.
- Andrews JW, Murai T (1978) Dietary niacin requirements for channel catfish. J Nutr 108: 1508-1511.
- Amlacher E, Ude J, Rudolph C, Ernst G (1980) Direct electron microscopical visualization of the presumptive virus of viral hemorrhagic septicaemia(VHS) in the rainbow trout(*Salmo gairdneri* Richardson) and additonal histopathological and haematological observations. J Fish Dis 3: 55-62.
- Butterworth CJ, Plumb JA, Grizzle JM (1986) Abnormal Folate Metabolism in Feed-Related Anemia of Cultured Channel Catfish(42223). Proc Soc Exp Bio Med 181: 49-58.
- Cameron JN, Davis JC (1970) Gas exchange in rainbow trout(*Salmo gairderi*) with varying blood oxygen capacity. J Fish Res Bd Canada 27: 1069-1085.
- Chudzik J, Houston AH (1982) Temperature and erythropoiesis in goldfish. Can J Zool 61: 1322-1325.
- Cotran RS, Kumar V, Collins T (1999) Pathologic Basis Of Disease. Sixth edition. W.B. Saunders Company, USA.
- Datta K, Soni JL, Awadhiya RP, Datta IC (1989) Erythrophgocytosis in phenylhydrazine induced acute anaemia in chickens. Rec Vet Sci 47: 136-137.

- Datta K, Soni JL, Datta IC (1990) Sequential morphological changes in chicken erythrocytes after in vivo and in vitro exposure to phenylhydrazine-hydrochloride. *Res Vet Sci* 48(1): 12-19.
- Duncan PL, Lovell RT, Butterworth CEJ, Freeberg LE, Tamura T (1993) Dietary folate requirement determined for channel catfish(*Ictalurus punctatus*). *J Nutr* 123: 1888-1897.
- Fange R (1994) Blood cells, haemopoiesis and lymphomyeloid tissues in fish. *Fish & Shellfish Immunology* 4: 405-411.
- Ferguson HW (1989) Systemic pathology of fish. Iowa state university, USA.
- Fijan N (2002) Morphogenesis of blood cell lineages in channel catfish. *J Fish Biol* 60: 999-1014.
- Fischer U, Ototake M, Nakanishi T (1998) Life span of circulating blood cells in ginbuna crucian carp(*Carassius auratus langsdorffii*). *Fish & shellfish Immunology* 8: 339-349.
- Hardig J, Hoglund LB (1984) Seasonal variation in blood components of reared Baltic salmon(*Salmo salar* L.). *J Fish Biol* 24: 565-579.
- Hillman RS (1978) Blood-loss anemia. *Postgrad Med* 64(4): 88-91.
- Hibiya T (1982) An Atlas of Fish Histology Normal and Pathological Features. Kodansha Ltd, Japan.
- Horton T, Okamura B (2003) Post-haemorrhagic anemia in sea bass(*Dicentrarchus labrax* (L.)), caused by Blood feeding of *Ceratothoa oestroides*(Isopoda: Cymothoidae). *J Fish Dis* 26: 401-406.
- Houston AH, Murad A (1995) Erythrodyamics in fish: recovery of the

- goldfish(*Carassius auratus*) from acute anemia. Can J Zool 73: 411-418.
- Houston AH, Murad A, Gray JD (1987) Induction of anemia in goldfish(*Carassius auratus* L.) by immersion in phenylhydrazine hydrochloride. Can J Zool 66: 729-736.
- Jones TC, Hunt RD (1983) Veterinary Pathology. Fifth edition. Lea & Febiger, 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.
- Lane HC (1980) The response of the haemoglobin system of fed and starved rainbow trout(*Salmo gairdneri* Richardson) to bleeding. J Fish Biol 16: 405-411.
- Lopez-Ruiz A, Esteban MA, Meseguer J (1992) Blood cells of the gilthead seabream(*Sparus aurata* L.): Light and electron microscopic studies. Anat

Rec 234: 161-171.

Lovell RT, Miyazaki T, Rabegnator S (1984) Requirement for alpha-tocopherol by channel catfish fed diets low in polyunsaturated triglycerides. J Nutr 114: 894-901.

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.

McLeod TF, Sigel MM, Yunist AA (1978) Regulation of erythropoiesis in the Florida gar (*Lepisosteus platyrhincus*). Comp Biochem Physiol 60A: 145-150.

Murad A, Everill S, Houston AH (1993) Division of gold fish erythrocytes in circulation. Can J Zool 71: 2190-2198.

Nakayasu C, Yoshinaga T, Kumagai A (2002) Hematological characterization of anemic recently prevailing in wild Japanese flounder in Japan. Fish Pathol 37(1): 38-40.

Noyes AD, Grizzle JM, Plumb JA (1991) Hematology and histopathology of an idiopathic anemia of Channel catfish. J Aquat Anim Health 3: 161-167.

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.

Schindler JF, Vries UD (1986) Scanning cytophotometry of carp (*Cyprinus carpio* L.) erythrocyte populations: the influence of short-term hypoxic

- environment and recovery period following severe bleeding. J Fish Biol 28: 741-752.
- 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: 73-81.
- Weinberg SR, Lobue J, Siegel CD, Gordon AS (1972) Studies on the Peripheral Blood Cell Parameters and Morphology of the Red Paradise Fish(*Macropodus opercularis*). Effect of Food Deprivation on Erythropoiesis. Anat Rec 175: 7-14.
- Weinberg SR, Lobue J, Siegel CD, Gordon AS (1976) Hematopoiesis of the kissing gourami(*Helostoma temminckii*). Effects of starvation, bleeding, and plasma-stimulation factors on its erythropoiesis. Can J Zool 54: 1115-1127.
- Wierenga PK, Konings AWT (1990) Effect of a hyperthermic treatment on the pluripotent hemopoietic stem cell in normal and anemic mice. Int J Hyperthermia 6: 793-800.
- Wolf K (1988) Fish virus and fish viral disease. Cornell university, USA.
- Zanjani ED, Yu ML, Perlmutter A, Gordin AS (1969) Humoral factors influencing erythropoiesis in the fish(Blue Gourami-*Trichogaster trichopterus*). Blood 33(4): 573-581.