



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

양식 강도다리, *Platichthys stellatus*
에 대한 Thioacetamide (TAA)의
병리조직학적 영향



수산생명의학과

정 다 혜

이 학 석 사 학 위 논 문

양식 강도다리, *Platichthys stellatus*
에 대한 Thioacetamide (TAA)의
병리조직학적 영향

지도교수 허 민 도

이 논문을 이학석사 학위논문으로 제출함.

2022년 8월

부 경 대 학 교 대 학 원

수산생명의학과

정 다 혜

정다혜의 이학석사 학위논문을 인준함.

2022년 8월 26일



위원장 약학박사 정준기 (인)

위원 이학박사 김광일 (인)

위원 농학박사 허민도 (인)

목 차

Abstract.....	ii
I. 서론.....	1
II. 재료 및 방법.....	6
1. 실험어 사육.....	6
2. TAA 주사.....	6
3. 샘플링 및 생체량 측정.....	8
4. 혈청 분석.....	9
5. 조직병리학적 분석.....	9
6. 통계학적 분석.....	10
III. 결과.....	11
1. 육안 검사 및 생체량 측정결과.....	11
2. 혈청 분석 결과.....	15
3. 조직병리학적 분석 결과.....	24
IV. 고찰.....	33
V. 요약.....	39
감사의 글.....	41
참고문헌.....	43

Histopathological effects of thioacetamide (TAA) on aquaculture
starry flounder, *Platichthys stellatus*

Da Hye Jeong

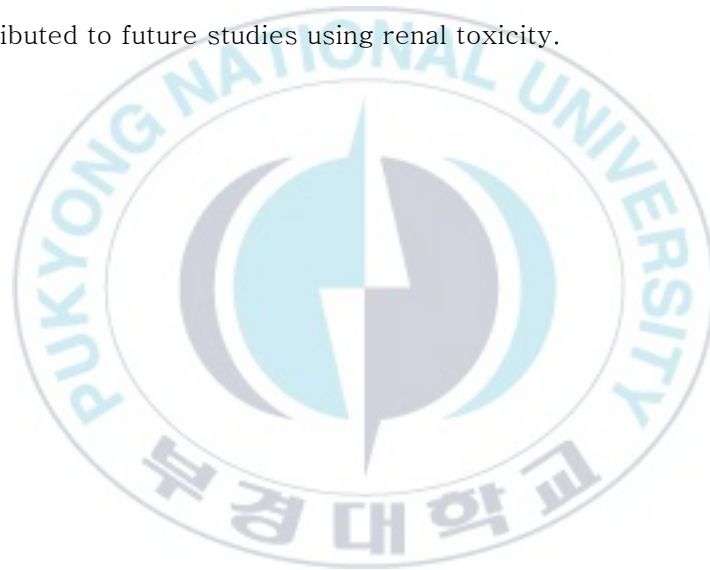
Department of *Aquatic life medicine*, Graduate School,
Pukyong National University

Abstract

In veterinary medicine, studies to confirm the effects of antioxidants using pathological toxicity model studies are in progress, and they are also used to confirm the alleviation effect of specific substances on the liver or kidney toxicity. It is considered necessary to study the toxicity model for domestic farmed fish, so a study was conducted to inject a toxic substance into *Platichthys stellatus*, which has recently been increasing in aquaculture production. After injection of thioacetamide (TAA), a toxic substance that causes oxidative stress by causing mitochondrial dysfunction, the effect was observed.

TAA 300mg/kg was injected intramuscularly and intraperitoneally and sampled after 1,3,5,7 days. As a result, in blood biochemical analysis, mitochondria-related GOT levels in the liver increased 1 day after intramuscular and intraperitoneal injection, and BUN and

creatinine related to kidney function significantly changed 5 days and 7 days after TAA injection. In histopathological analysis, acute tubular damage such as tubular vacuolation, tubular epithelial apoptosis, and tubular epithelial necrosis appeared from 3 days to 7 days after TAA injection, and lesions could be observed. During intraperitoneal injection of TAA, hemorrhage, inflammation, and necrosis were observed in the epicardial membrane, but no significant lesions were found in the hepatocyte parenchyma. Although this study did not confirm the histopathological effect on liver damage, it was confirmed that kidney damage could be contributed to future studies using renal toxicity.



I. 서 론

우리나라 양식산업에서 가장 큰 비중을 차지하고 있는 해산어종은 넙치로 알려져 있으나, 한 어종으로 양식이 편향되는 것을 방지하고 넙치 생산에서 문제가 발생할 시 대체할 수 있는 새로운 품종을 필요로 하여 강도다리를 양식하기 시작하였다. 강도다리, *Platichthys stellatus* 는 우리나라 동해에서 오호츠크해를 거쳐 미국 남부 캘리포니아까지 서식하는 동계 산란 종으로 주로 낮은 수온지역에서 서식하는 종이다 (Chyung, 1977; Lim et al., 2007; 이 등, 2021). 강도다리는 넙치와 같은 양식시설에서 양식할 수 있어 동해안의 일부 육상수조식 넙치 양식장에서 소규모로 사육되기 시작하였으며 (Cho et al., 2008), 최근 동해안에서 넙치 대체 품종으로 가자미과 어류를 많이 양식하고 있다. 최근 생산량이 증가하여 넙치류의 2020년 양식 생산량이 43,813톤, 2021년 양식 생산량이 41,791톤으로 감소한 것에 비해 가자미류는 2020년 양식 생산량이 3,336톤, 2021년 양식 생산량이 6,214톤으로 증가하는 추세이다 (<https://kosis.kr>, 2020-2021년 어업 품종별 생산량). 증가하는 양식 생산량과

비례하여 점차 강도다리에 대한 연구도 증가하고 있으며, 최근 국내에서는 영양학적 연구로 강도다리의 절식에 대한 생리 및 조직학적 특성을 조사하거나 (Kim et al., 2013), 납 노출에 대한 강도다리의 항산화 및 신경전달물질에서 독성영향연구 (Park et al., 2018)와 같은 독성 연구도 보고되고 있다. 국외에서는 자연산 강도다리의 비정상 장기에 대한 조직학적 연구가 이루어진 바 있으며 (Pierce et al., 1980), 강도다리에서 화학오염물에 대한 노출과 간병변의 관계에 대한 연구를 통해 (Myers et al., 1994) 강도다리 병리에 대한 연구를 진행하였으나, 국내에서의 강도다리에 대한 조직병리학적 연구는 아직 부족한 실정이며, 앞으로 강도다리에 대한 국내 양식 생산량 증가는 지속될 전망이 있어 양식 강도다리를 대상으로 어류 질병 관리에 대해 기초가 되는 임상병리 및 조직병리학적 연구가 많이 필요하다.

본 학위 논문은 인위적으로 병변을 발생시키는 독성화학물질에 관한 내용으로, 양식어류에서 자연발생하기 어려운 병변들을 뚜렷하게 관찰하기 위해 독성물질을 투여함으로써 발생하는 병리학적 병변에 대하여 연구하였다.

간장은 체내 항상성 면역기관으로 해독기능을 하는 것으로 알려져 있으며 (Hibiya et al., 1982), 배설기관인 신장도 생체의 항상성을 유지시키기 위한 주요 장기로서 어류에서 중요한 역할 (Iqbal et al., 2004)을 가지기 때문에 본 연구에서는 간장 및 신장을 중점적으로 관찰하였다. 포유류에서는 인위적으로 독성물질을 투여하는 독성모델을 통해 여러가지 연구가 진행되고 있으며 (Bhakuni et al., 2016), 랫트에서는 간손상으로 인한 독성 모델을 기반으로 항산화 물질이나 면역 물질에 대한 치료 및 예방 효과를 분석하고 있고 (Yang et al., 2010), 신장에서도 화학물질 및 약물로 유도된 독성모델을 연구하여 여러가지 바이오마커에 대하여 평가한 바 있다 (Sasaki et al., 2011). 포유류에서 독성모델 개발을 위해 사용하는 물질은 주로 합성 화학 물질로 독성모델을 만들기 위해 가장 흔하게 사용되는 carbon tetrachloride(CCl_4), 간경화와 다병소 간세포암을 발생시키는 diethylnitrosamine(DENA), 간경화를 유도시키는 thioacetamide(TAA) 등이 있으며, 이와 같은 물질들은 주로 복강 내 혹은 피하 주사법을 통해 주입된다고 알려져 있다 (주 등, 2017). 그 중 본 실험에서 사용하고자 하는 thioacetamide(TAA)는 간 손상을 유발하며 물에 높은

친화성을 갖는 유기 황 화합물로, thioacetamide-S-oxygenase 에 의해 촉매되어 산화 과정을 통해 반응성 중간 매개체인 thioacetamide-S-oxide(TAASO) 부가산물을 형성하고, 이는 간세포 산화 스트레스를 유도하여 세포 막 투과성과 Ca^{2+} 흡수의 변화를 담당하는 세포의 고분자에 결합하여 Ca^{2+} 농도를 증가시킬 뿐만 아니라 미토콘드리아 활성을 억제하여 결과적으로 소엽 중심 괴사의 효과로 간독성을 유발하는 메커니즘을 가지고 있다 (Bruck et al., 2004; Hajovsky et al., 2012; Akhtar et al., 2013; Ihegboro et al., 2022). 또한, thioacetamide(TAA)는 신장의 근위세뇨관에도 독성 영향을 주는 것으로 알려져 있다 (Barker and Smuckler, 1974).

어류에서는 제브라피쉬에서 Thioacetamide(TAA)로 유도된 간독성모델을 제작하기 위해 연구된 적이 있으며 (Rekha., 2008), 최근 넙치에서 간 기능 회복을 확인하기 위해 연구된 바 있다 (최 등., 2020).

산화 스트레스는 간장뿐만 아니라 심장, 췌장, 신장, 폐 등의 장기에다 영향을 주는 것으로 알려져 있으며 (Ogura et al.,

2014), 어류에서도 간장과 신장의 허혈성 기능 손상에 영향을 주는 것으로 알려져 있다 (Javed et al., 2017).

어류에서는 이미 중금속 노출을 통하여 많은 산화스트레스 연구가 이루어지고 있지만 (Ventura-Lim et al., 2009; Min et al., 2014), 본 연구의 목적은 산화스트레스를 유발하는 독성물질에 의한 어류의 조직병리학적 변화를 보는 것으로 어류 체내로 독성물질을 직접적으로 투여하기 위해 근육 내 주사(intramuscular injection) 및 복강 내 주사(intraperitoneal injection)를 통하여 TAA 를 투여하였으며, TAA 주사 균을 각 주사 방법에 따라 멸균증류수를 주사한 대조군과 비교하여 산화스트레스 유발 독성물질의 시간대별 혈액생화학적 및 조직병리학적 영향에 대해 알아보고자 했다.

II. 재료 및 방법

1. 실험어 사육

실험에 사용된 강도다리, *Platichthys stellatus* 는 울산광역시 울주군 서생면 소재 강도다리 양식장으로부터 평균 체중은 146.95 ± 23.38 g, 평균 전장은 20.61 ± 1.06 cm 인 개체를 구입하여 7 일간 순치 후 사용하였다. 실험을 위한 사육 수조는 72cm × 52cm × 28cm 크기의 PE 타원형 수조 4 개를 사용하였고, 각 수조에 별도의 외부여과기(유량 1400L/H)를 설치한 뒤 수온 18.6-19.8℃ 를 유지하였다. 각 수조당 강도다리 20 마리를 사육하였으며, 3 일에 한 번 50%의 물을 환수해주었다.

2. TAA 주사

예비 실험으로 thioacetamide(TAA, Sigma)를 멸균증류수에 희석하여 100mg/kg, 200mg/kg, 300mg/kg, 400mg/kg, 500

mg/kg 의 농도로 개체당 200 μ l 의 양에 대하여 insulin syringe(BD)로 intramuscular injection 을 실시하였다. 그 결과, 9 일 차부터 400mg/kg 농도에서 폐사가 발생하여 실험어의 폐사가 나타나지 않으면서 가장 뚜렷한 조직병리학적인 반응을 보이는 농도는 TAA 300mg/kg 으로 결정되었다. 따라서, 본 실험에서도 예비실험 결과에 따라 TAA 300mg/kg 농도로 개체당 200 μ l 씩 insulin syringe(BD)로 intramuscular injection 을 실시하였으며, 주사 방법에 대한 비교군 설정을 위해 동일 농도에 대하여 intraperitoneal injection 도 실시하였다. TAA 300mg/kg 을 멸균증류수에 희석하여 개체당 200 μ l 의 양으로 intramuscular injection 실시한 실험군을 IMT 군, 동량의 멸균증류수만 intramuscular injection 실시한 대조군을 IMC 군, TAA 300mg/kg 을 멸균증류수에 희석하여 개체당 200 μ l 의 양으로 intraperitoneal injection 실시한 실험군을 IPCT 군, 동량의 멸균증류수만 intraperitoneal injection 실시한 대조군을 IPC 군으로 명명하였다. 각 군은 20 마리씩 injection 을 실시하였으며, 1 일, 3 일, 5 일, 7 일에 군당 5 마리씩 샘플링하였다.

3. 샘플링 및 생체량 측정

샘플 채취 시 MS-222 100ppm 으로 샘플을 마취한 뒤 전장, 표준체장, 어체중, 간장 무게를 측정한 후 3ml 주사기를 사용하여 미부정맥에서 채혈한 후 복부절개를 통해 내부장기의 육안검사 후 장기를 적출하여 10% 중성 포르말린 (10% NBF)에 고정하였다. 채혈 시에는 혈액을 BD Vacutainer SST tube (Becton, Dickinson)에 담고, 3,000rpm으로 20분간 원심분리후 혈청을 분리하였다. 분리된 혈청은 -80℃ deep freezer 에 보관하였다. 간장체중비 중량 (Hepatosomatic index, HSI)은 아래와 같이 구하였다.

$$\text{간장체중비 중량 (\%)} = \text{간장 무게(g)}/\text{어체중(g)} \times 100$$

4. 혈청 분석

보관된 혈청은 냉장상태로 해동한 후 혈청자동분석기 (FUJI DRI-CHEM NX500i; Fujifilm Co., Tokyo, Japan)를 사용하여 Glutamic oxalacetic transaminase (GOT), Glutamic pyruvic transaminase (GPT), Blood urea nitrogen (BUN), Creatinine (CREA), Alkaline phosphatase (ALP), Gamma(γ)-glutamyl transferase (GGT) 항목을 측정하였다.

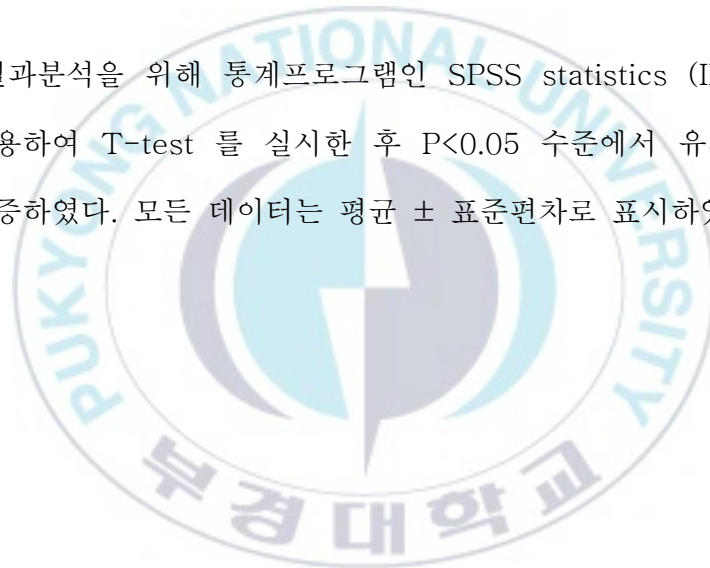
5. 조직병리학적 분석

샘플링을 통해 10% 중성 포르말린 (10% NBF)에 전고정된 장기는 하루 뒤에 병변 확인 후, 동일 고정액으로 후 고정 및 capsuling 하였다. 후 고정 후 24 시간 내에 수세를 실시하고 70% 에틸 알코올 수용액에서 100% 에틸 알코올까지 순차적 농도로 탈수하였다. Xylene 으로 투명화하여 파라핀을 친화시키고, 파라핀을 침투시켜 포매한 후 회전형 박절기 (RM 2125 RTS, Leica, Germany)를 사용하여 4 μ m 두께의

박편을 얻어 Hematoxylin & Eosin 염색을 실시하였다. 제작된 조직 슬라이드는 광학현미경 (BX50, OLYMPUS, Japan)으로 검경하였으며, 현미경용 디지털 사진촬영장치 (DP-72, OLYMPUS, Japan)를 사용하여 현미경 사진을 얻었다.

6. 통계학적 분석

결과분석을 위해 통계프로그램인 SPSS statistics (IBM)을 사용하여 T-test 를 실시한 후 $P < 0.05$ 수준에서 유의성을 검증하였다. 모든 데이터는 평균 \pm 표준편차로 표시하였다.

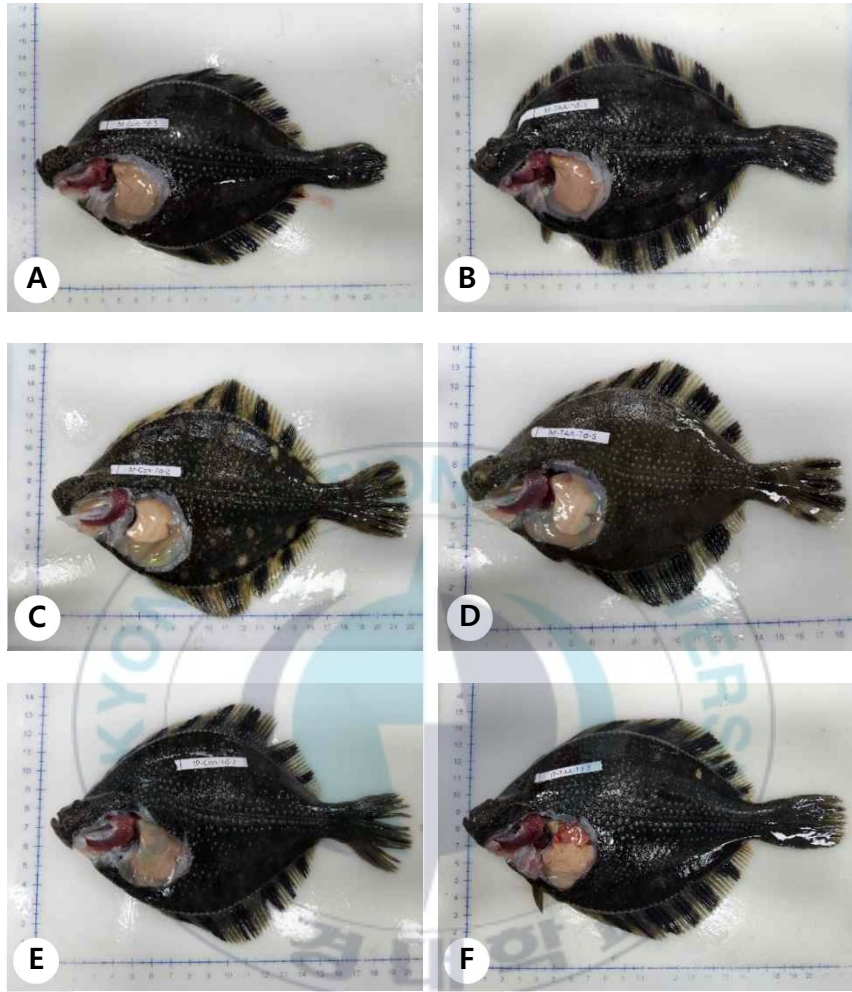


Ⅲ. 결과

1. 육안 검사 및 생체량 측정결과

1. 육안 검사 결과

TAA injection 후 1, 3, 5, 7 일 차 IMC 군, IMT 군, IPC 군, IPT 군에 대하여 육안 검사 결과 IMC 군과 IMT 군 사이에는 모든 샘플링 구간에서 유의미한 차이가 관찰되지 않았다. IPC 군은 육안검사 결과 정상소견을 보였으나, IPT 군은 IPC 군과 비교하여 TAA injection 후 1 일 차부터 간장외막에 출혈 소견이 나타나기 시작하여 7 일 차까지 지속되었다 (Fig. 1). TAA injection 후 5 일차에서 간장외막의 출혈이 가장 심각하게 나타났다 (Fig. 2).



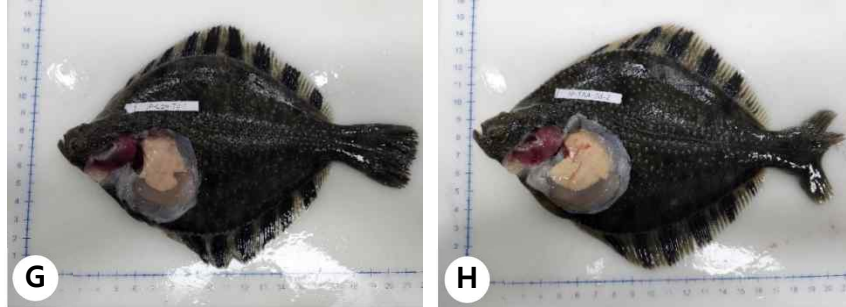


Fig. 1. Starry flounders at 1day (A),(B),(E),(F) and 7days (C),(D),(G),(H) after TAA injection. (A),(C) IMC groups' liver is normal. (B),(D) IMT groups' liver is normal. (E),(G) IPC groups' liver is normal. (F),(H) Outer membrane of IPT groups' liver is hemorrhage.



Fig. 2. 5 days after TAA injection, the most severe hemorrhage occurred in outer membrane of IPT groups' liver.

2. 생체량 측정결과

TAA injection 후 1, 3, 5, 7 일 차 IMC 군, IMT 군, IPC 군, IPT 군 각 5 마리에 대한 HSI (%) 측정 결과, 통계학적으로 유의미한 차이는 없으며 그 결과는 Table 1 에 나타내었다.

Table 1. Hepatosomatic index (HSI) of IMC, IMT, IPC, IPT groups

Day(s)	Intramuscular injection		Intraperitoneal injection	
	CON	TAA	CON	TAA
1	1.81 ± 0.5	1.41 ± 0.22	1.7 ± 0.52	1.9 ± 0.43
	1.58 ± 0.38	1.5 ± 0.27		1.4 ± 0.4
3	1.69 ± 0.21	1.55 ± 0.15	1.91 ± 0.53	1.75 ± 0.4
	1.31 ± 0.28	1.45 ± 0.21		1.2 ± 0.26

2. 혈청 분석 결과

1. Glutamic oxalacetic transaminase (GOT)

IMC 군과 IMT 군 GOT 항목 사이의 유의성은 주사 후 1 일 차, 3 일 차에서 나타났으며, IMT 군의 GOT 항목 수치가 증가하였고, IPC 군과 IPT 군 사이의 유의성은 주사 후 1 일 차에서 나타났으며 IPT 의 GOT 항목 수치가 증가하였다. 나머지 시점에서는 유의성이 나타나지 않았다 (Fig. 3).

2. Glutamic pyruvic transaminase (GPT)

IMC 군과 IMT 군 GPT 항목 사이, IPC 군과 IPT 군 GPT 항목 사이의 유의성은 모든 샘플링 구간에서 나타나지 않았다 (Fig. 4).

3. Blood urea nitrogen (BUN)

IMC 군과 IMT 군 BUN 항목 사이의 유의성은 주사 후 1 일 차, 3 일 차, 7 일차에서 나타났으며, IMT 군의 BUN 항목 수치가 1 일 차와 3 일 차에는 감소하였고, 7 일 차에는 증가하였다. IPC 군과 IPT 군 BUN 항목 사이의 유의성은 주사 후 5 일 차에서 나타났으며, IPT 군의 BUN 항목 수치가 증가하였다 (Fig. 5).

4. Creatinine (CREA)

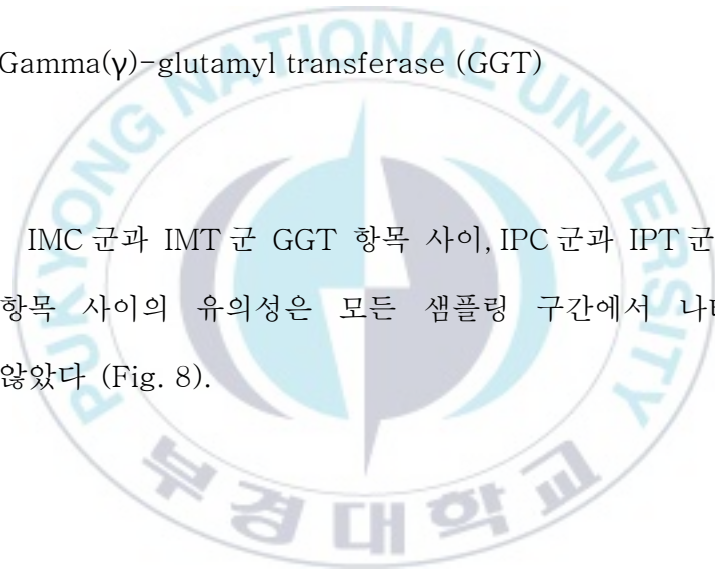
IMC 군과 IMT 군의 CREA 항목 사이의 유의성은 주사 후 5 일차에서 나타났으며, IMT 군의 CREA 항목 수치가 증가하였다. IPC 군과 IPT 군의 CREA 항목 사이의 유의성은 주사 후 7 일 차에서 나타났으며, IPT 군의 CREA 항목 수치가 증가하였다 (Fig. 6).

5. Alkaline phosphatase (ALP)

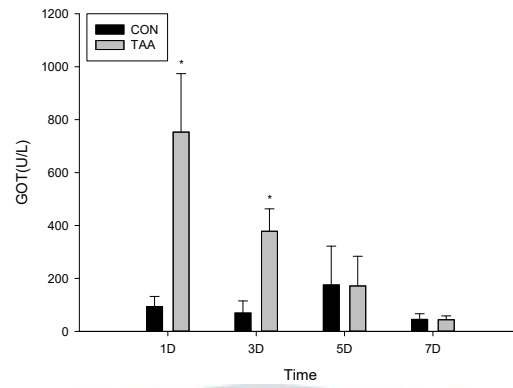
IMC 군과 IMT 군 ALP 항목 사이, IPC 군과 IPT 군 ALP 항목 사이의 유의성은 모든 샘플링 구간에서 나타나지 않았다 (Fig. 7).

6. Gamma(γ)-glutamyl transferase (GGT)

IMC 군과 IMT 군 GGT 항목 사이, IPC 군과 IPT 군 GGT 항목 사이의 유의성은 모든 샘플링 구간에서 나타나지 않았다 (Fig. 8).



(A)



(B)

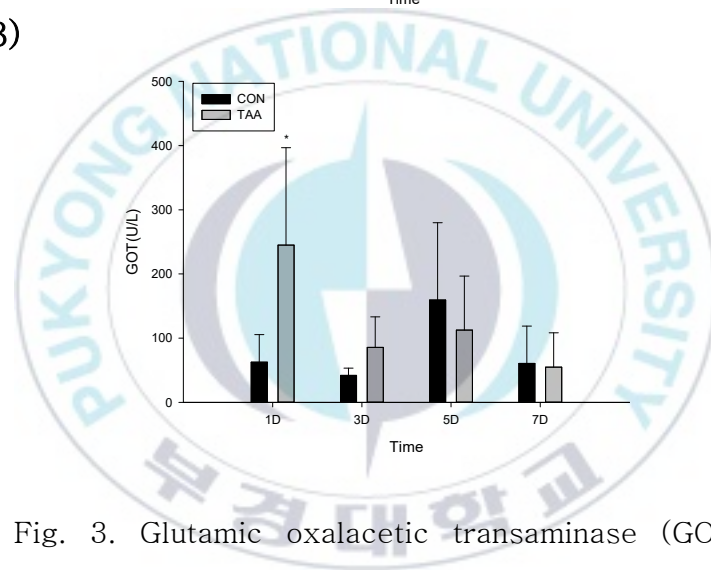
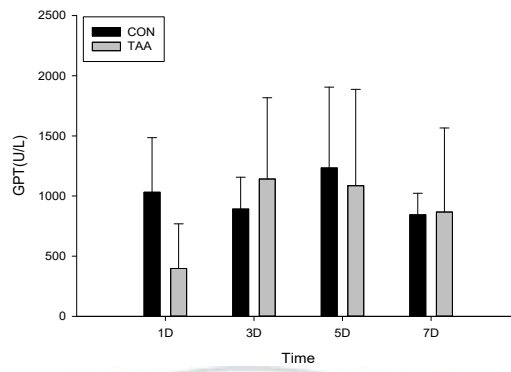


Fig. 3. Glutamic oxalacetic transaminase (GOT) in injected intramuscularly and intraperitoneally starry flounder. Values are means \pm SD (n=5, number per group). (* P<0.05)

(A) Intramuscular injection (B) Intraperitoneal injection

(A)



(B)

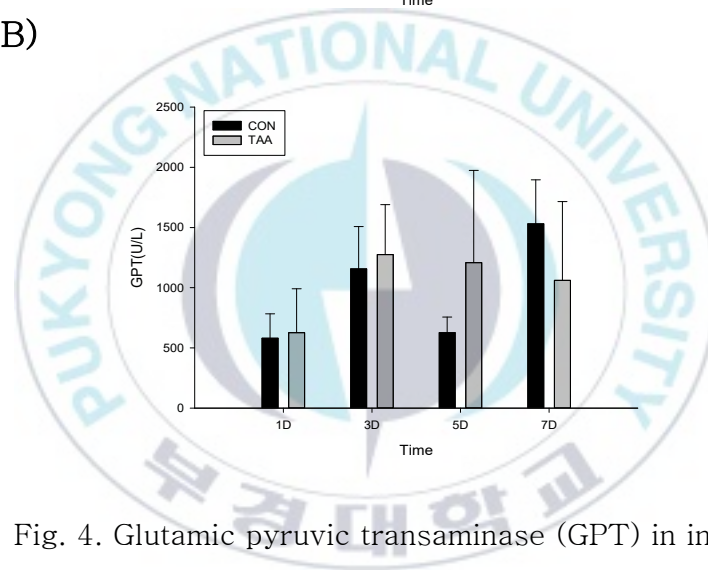
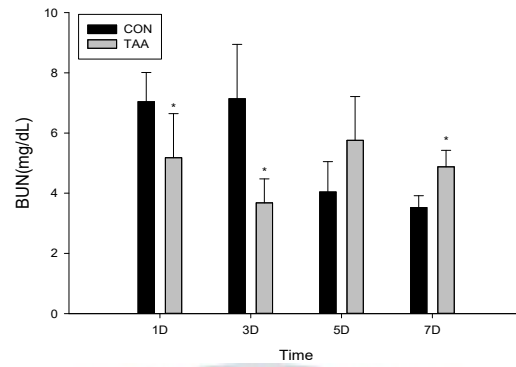


Fig. 4. Glutamic pyruvic transaminase (GPT) in injected intramuscularly and intraperitoneally starry flounder. Values are means \pm SD (n=5, number per group). (* P<0.05)

(A) Intramuscular injection (B) Intraperitoneal injection

(A)



(B)

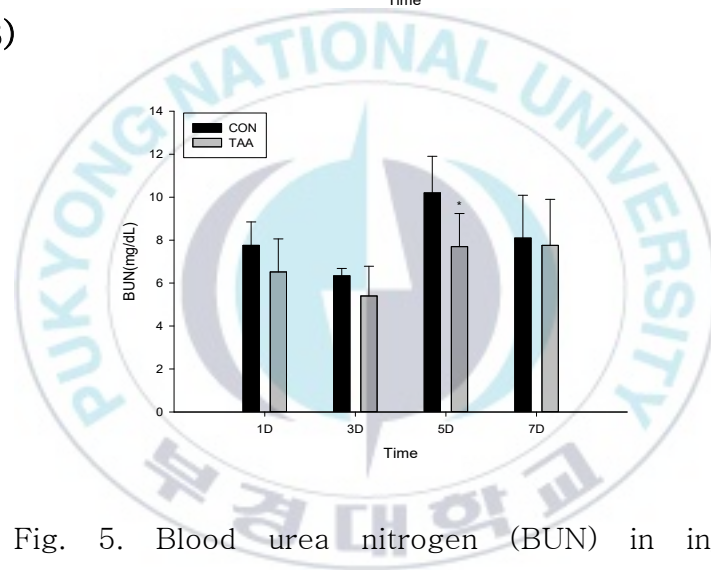
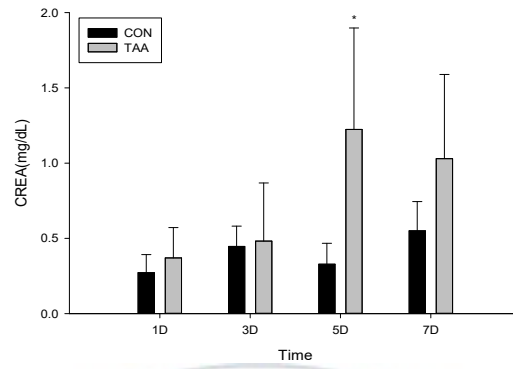


Fig. 5. Blood urea nitrogen (BUN) in injected intramuscularly and intraperitoneally starry flounder. Values are means \pm SD (n=5, number per group). (* P<0.05)

(A) Intramuscular injection (B) Intraperitoneal injection

(A)



(B)

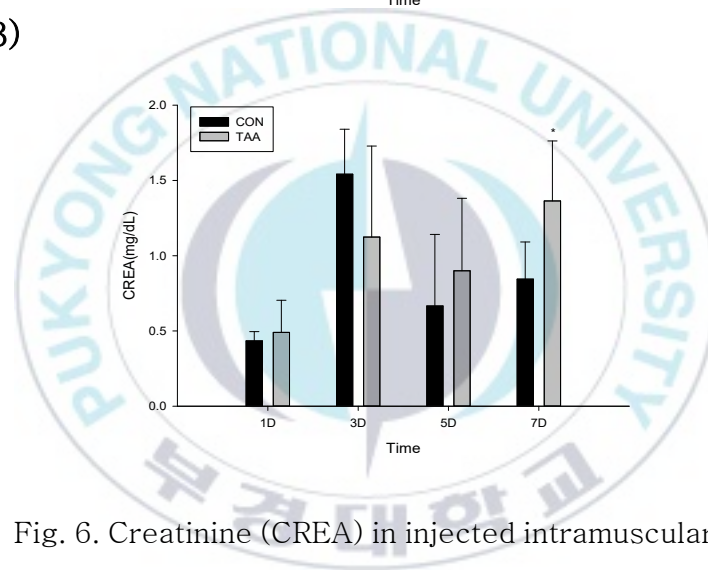
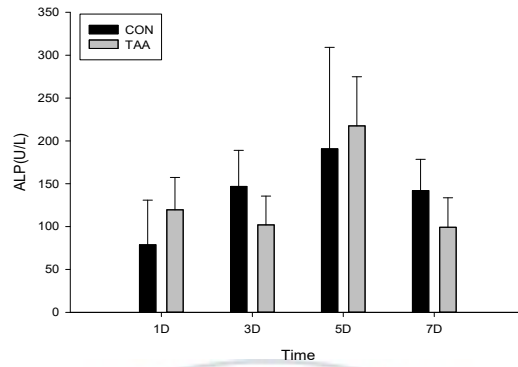


Fig. 6. Creatinine (CREA) in injected intramuscularly and intraperitoneally starry flounder. Values are means \pm SD (n=5, number per group). (* P<0.05)

(A) Intramuscular injection (B) Intraperitoneal injection

(A)



(B)

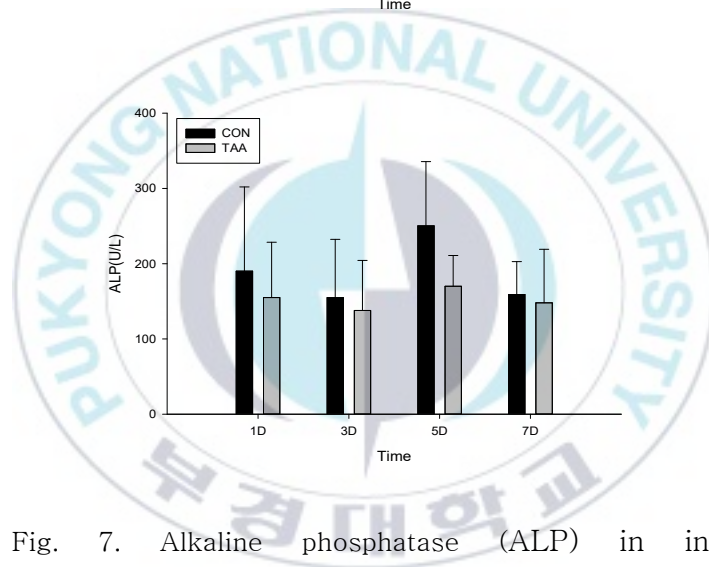
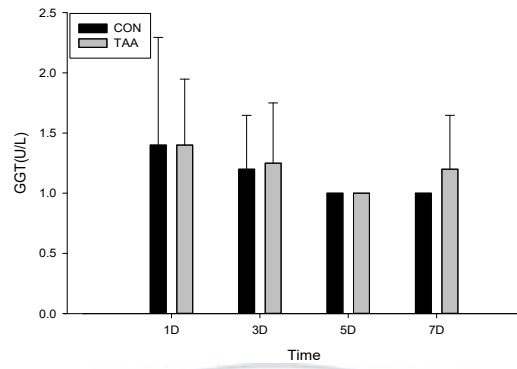


Fig. 7. Alkaline phosphatase (ALP) in injected intramuscularly and intraperitoneally starry flounder. Values are means \pm SD (n=5, number per group). (* P<0.05)

(A) Intramuscular injection (B) Intraperitoneal injection

(A)



(B)

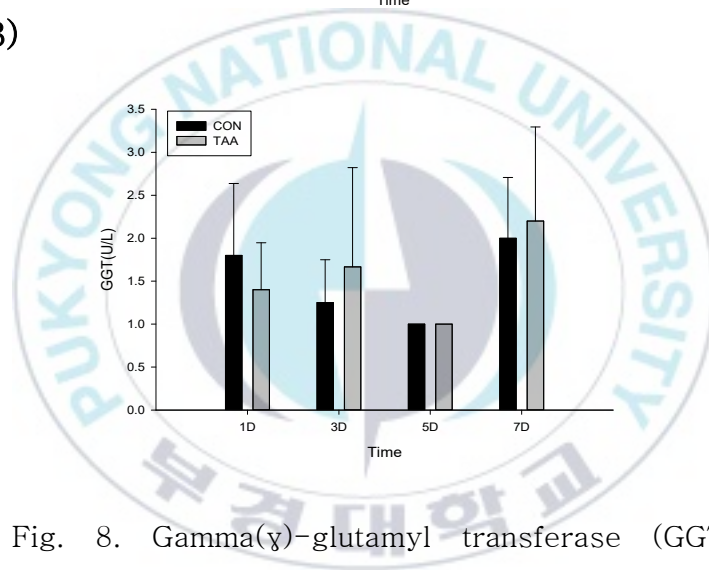


Fig. 8. Gamma(γ)-glutamyl transferase (GGT) in injected intramuscularly and intraperitoneally starry flounder. Values are means \pm SD (n=5, number per group). (* P<0.05)

(A) Intramuscular injection (B) Intraperitoneal injection

3. 조직병리학적 분석 결과

광학현미경 관찰 시 IMC 군, IMT 군, IPC 군, IPT 군의 주사 후 1 일, 3 일, 5 일, 7 일 차 개체의 간장 조직은 대부분의 개체가 간세포가 비대 되어 있는 것을 확인할 수 있었다. 간세포 비대가 나타나면 간세포질에 지방적(lipid droplet)과 글리코젠(glycogen)으로 공간이 채워져 있으며, 이로 인해 매우 밝은 염색성을 가지는 것이 관찰되었다. 또한, 비대된 간세포의 핵은 정상적인 크기를 가지나 주로 동양혈관(sinusoidal capillary)쪽으로 편재되어 있는 것을 관찰할 수 있다. 일부 개체는 간세포의 대부분을 1 개의 커다란 지방적이 차지하는 대세포성 지방변화(macrovesicular steatosis)의 형태도 관찰되었다 (Fig. 9, 10).

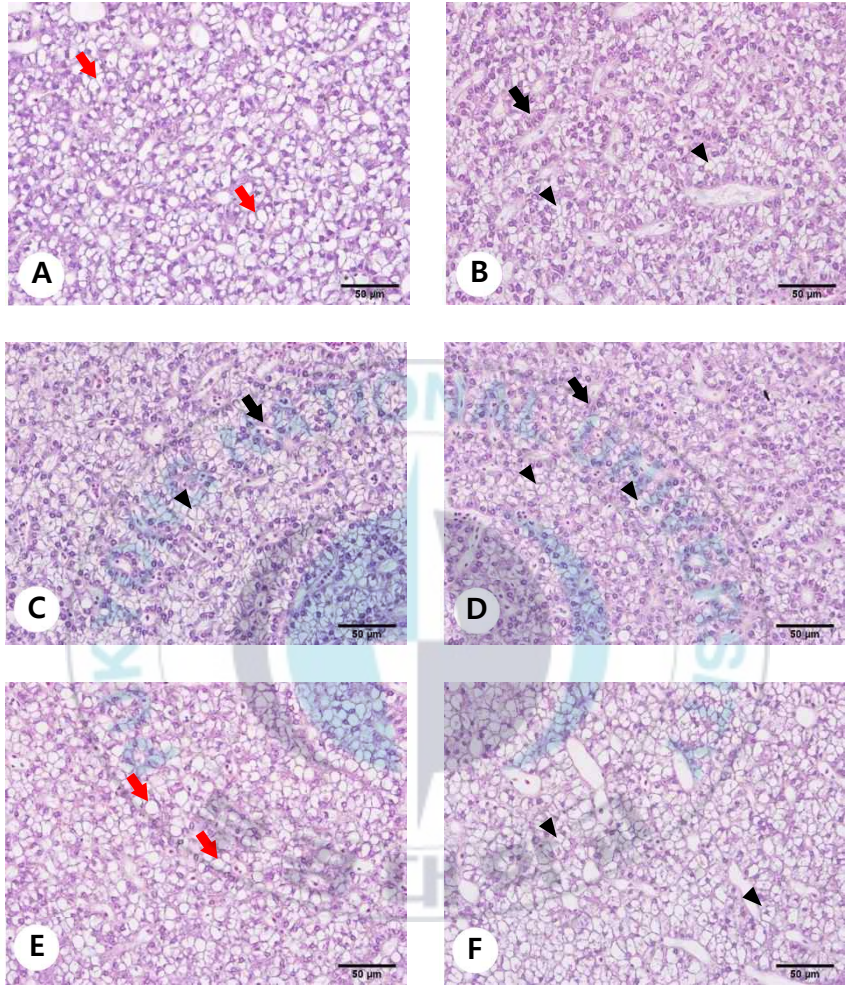
내부 임상 검사 결과에서 간장의 외막에 출혈(hemorrhage)이 나타났던 IPT 군의 간장 조직은 광학현미경 관찰 시에도 주사 후 1 일차부터 7 일 차까지

간장 외막의 결합조직에서 출혈과 국소적인 피사성 변화를 관찰할 수 있었다 (Fig. 11).

일부 개체에서는 동양혈관이 확장되고 간세포판의 형태가 유실되며 무질서한 간세포 배열을 보이는 간세포 위축(atrophy)이 관찰되었다 (Fig. 9, 10).

IMT 군과 IPT 군 모두 TAA 주사 후 1 일 차에는 체신 조직에서 큰 변화가 없었으나, 3 일 차에는 IMT 군에서 세뇨관 상피세포에 경도의 세뇨관 공포화(tubular vacuolization)가 관찰되기 시작했으며, 일부개체에서 IPT 군에서도 일부 개체에서 세뇨관 공포화가 관찰되었다. 5 일 차에는 IMT 군과 IPT 군 모두 중등도의 세뇨관 공포화와 세뇨관 상피세포의 apoptosis 가 관찰되었으며, 세뇨관 상피세포의 경도 위축이 관찰되었다. 7 일 차에는 IMT 군과 IPT 군 모두 경도의 세뇨관 공포화와 세뇨관 상피세포의 피사, 세뇨관 상피세포의 경도 위축이 관찰되었다 (Fig. 12, 13).

그 외 장기에서는 유의미한 병변이 나타나지 않았다.



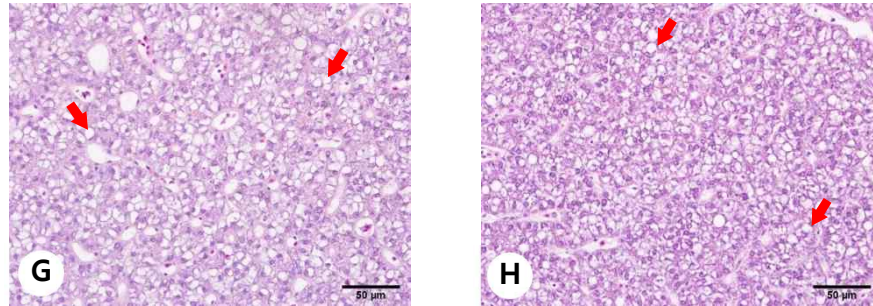
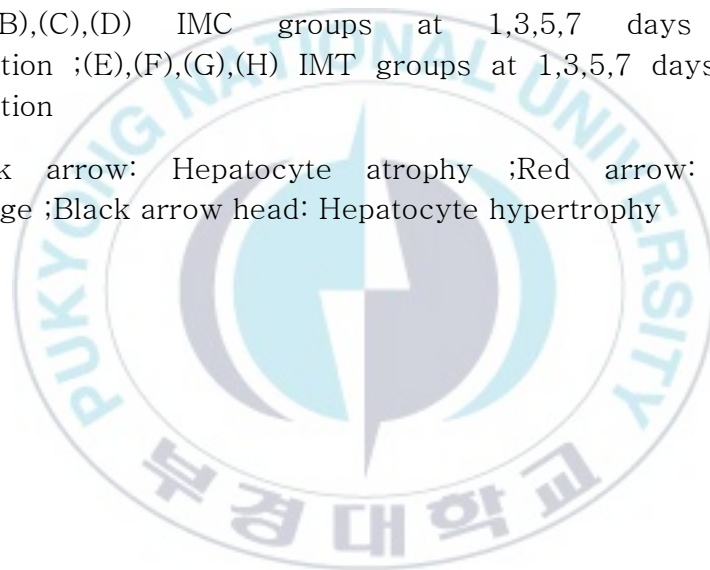
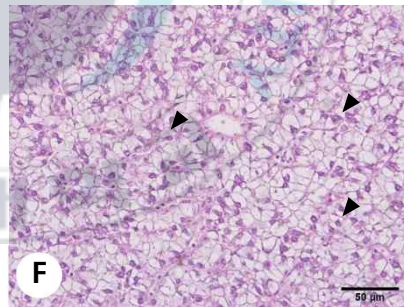
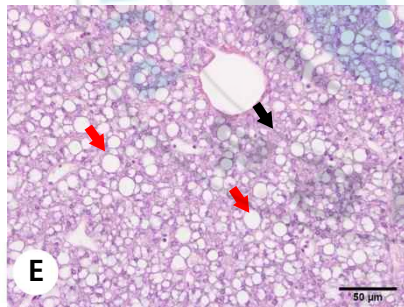
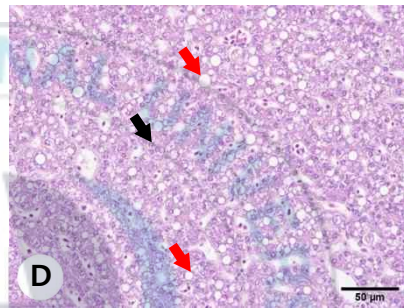
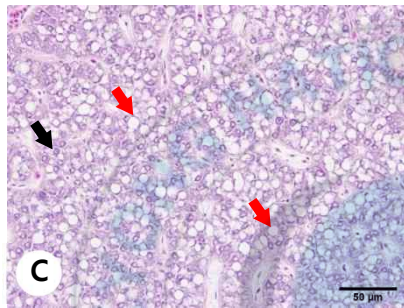
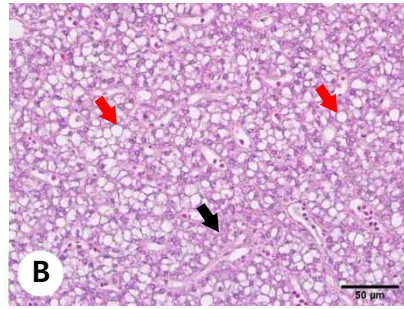
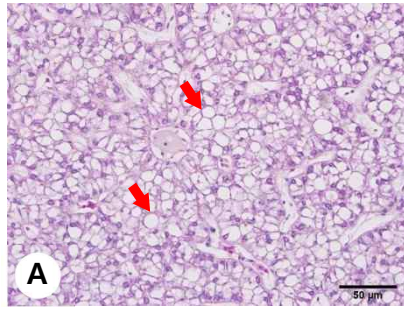


Fig. 9. Photomicrographs show liver with intramuscular injection starry flounder groups, (H&E stain x 400)

(A),(B),(C),(D) IMC groups at 1,3,5,7 days post injection ;(E),(F),(G),(H) IMT groups at 1,3,5,7 days post injection

Black arrow: Hepatocyte atrophy ;Red arrow: fatty change ;Black arrow head: Hepatocyte hypertrophy





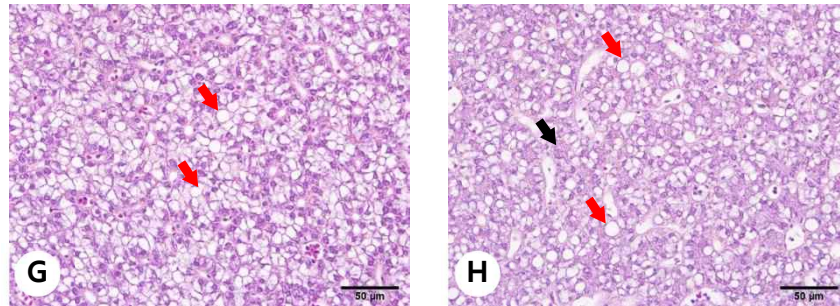
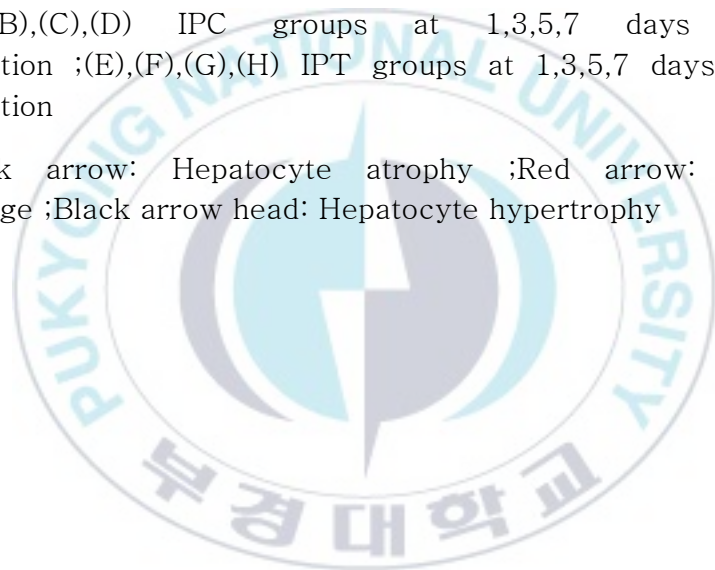


Fig. 10. Photomicrographs show liver with intraperitoneal injection starry flounder groups, (H&E stain x 400)

(A),(B),(C),(D) IPC groups at 1,3,5,7 days post injection ;(E),(F),(G),(H) IPT groups at 1,3,5,7 days post injection

Black arrow: Hepatocyte atrophy ;Red arrow: fatty change ;Black arrow head: Hepatocyte hypertrophy



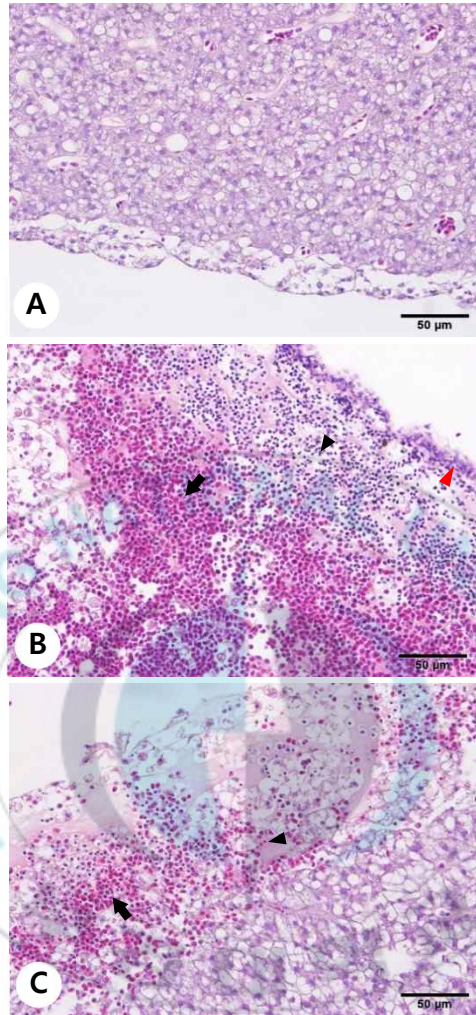


Fig. 11. Photomicrographs show liver with intraperitoneal injection starry flounder groups, (H&E stain x 400) (A) IPC group (B),(C) IPT group

Black arrow: Membrane hemorrhage ;Black arrow head: Membrane necrosis ;Red arrow head: Lymphocytic infiltration

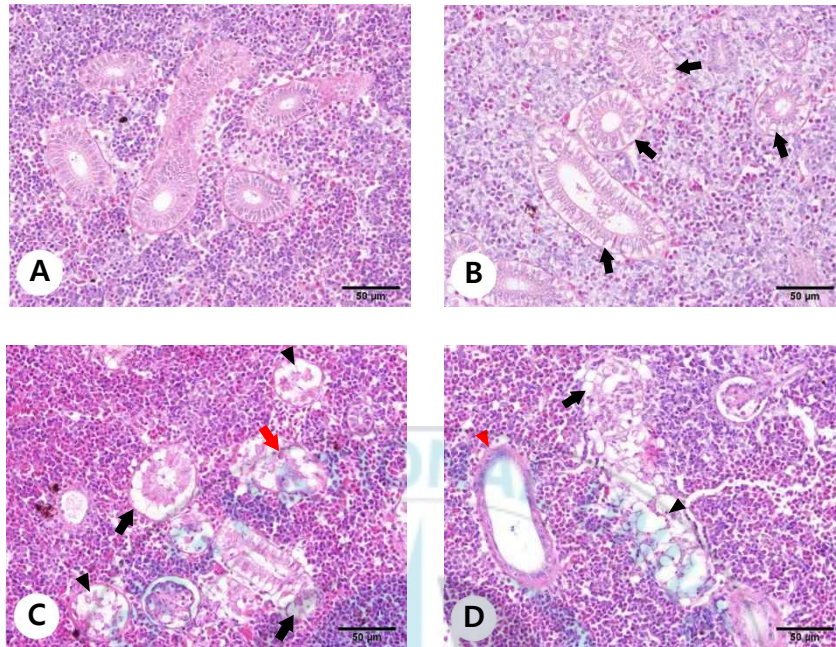


Fig. 12. Photomicrographs show body kidney with intramuscular injection starry flounder groups, (H&E stain x 400)

(A) IMC group (B) IMT groups at 3 days post injection (C) IMT groups at 5 days post injection (D) IMT groups at 7 days post injection

Black arrow: Tubular vacuolization ;Red arrow: Apoptotic cell ;Black arrow head: Tubular necrosis ;Red arrow head: Tubular atrophy

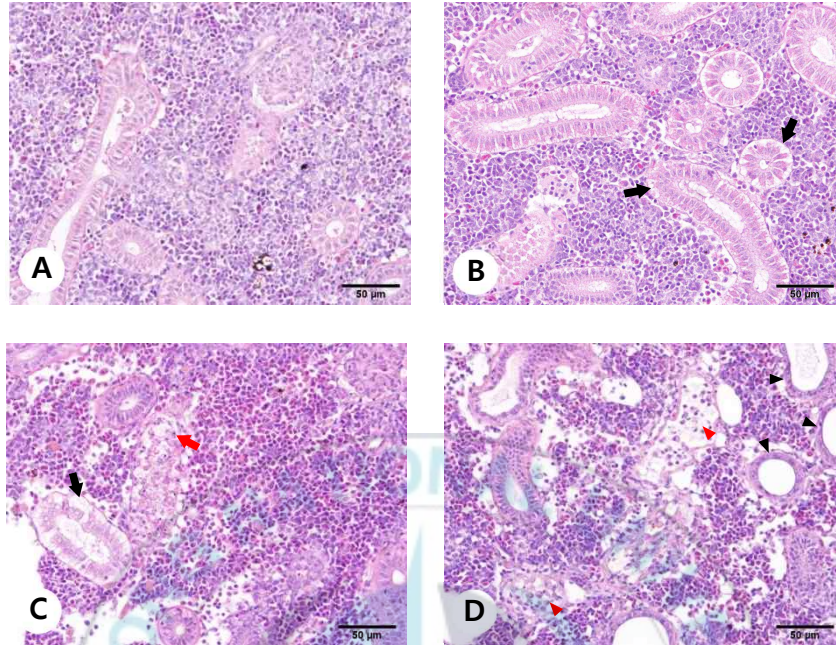


Fig. 13. Photomicrographs show body kidney with intraperitoneal injection starry flounder groups, (H&E stain x 400)

(A) IPC group (B) IPT groups at 3 days post injection (C) IPT groups at 5 days post injection (D) IPT groups at 7 days post injection

Black arrow: Tubular vacuolization ;Red arrow: Apoptotic cell ;Black arrow head: Tubular necrosis ;Red arrow head: Tubular atrophy

IV. 고찰

본 연구에서 양식어류인 강도다리에 독성 물질을 투여함으로써 조직병리학적 결과를 관찰하였으며, 간장에서는 이미 만연한 지방간으로 인하여 대조군과 실험군의 차이를 구분할 수 없었으나 체신에서 급성 독성 물질에 의한 급성 세뇨관 손상을 시간대별로 확인할 수 있었다. 특히 연구 결과로 TAA 주사 후 5 일 차와 7 일 차에서 체신의 세뇨관 상피가 자멸사 후 근위 세뇨관이 부분적으로 괴사되는 전형적인 허혈성 급성 세뇨관 손상 병변을 나타냈으며 (Mandal et al., 1982), 이러한 급성 세뇨관 손상은 미토콘드리아의 기능장애로 나타나는 산화 스트레스로 인하여 나타날 수 있다 (Silver et al., 2015). 따라서, 본 연구에서 TAA 로 인해 강도다리의 체신에서 세뇨관 급성 손상이 나타난 것은 포유류에서 산화스트레스를 유발한다고 알려져 있는 TAA (Ghosh et al., 2016) 가 양식 강도다리에서도 허혈을 유발할 수 있는 산화스트레스를 일으킨다고 볼 수 있다.

혈액생화학적 분석에서 Glutamic oxalacetic transaminase (GOT), Glutamic pyruvic transaminase (GPT) 항목은 두 효소 모두 간세포 내에 존재하여 간세포 손상 시 혈중으로 유출되어 간기능을 평가하는 기초검사항목으로서 잘 알려져 있으나, GOT 는 미토콘드리아와 간세포질 내에 분포하고 있는 반면 GPT 는 간세포질에만 국한되어 있다 (Choi et al., 2020). 본 연구의 TAA 주사군에서 대조군에 대비하여 간장 병변이 유의하게 나타나지 않았음에도 GOT 수치가 높아지는 이유는 TAA 로 인한 산화스트레스 유발로 미토콘드리아의 기능장애가 발생했기 때문으로 볼 수 있다. 반면, 인체에서 지방간 발생 시 GPT 수치가 증가할 수 있다는 보고 (Lee et al., 2006)를 참고하여, GPT 수치가 대조군, 실험군 사이에 유의성 없이 모두 높게 나오는 이유는 간세포질에만 존재하는 GPT 가 지방간에 따른 간 세포질 기능 저하에 의한 영향을 받았을 것으로 사료된다. 담관 세포에 존재하여 담즙정체와 관련되어 있는 효소인 Alkaline phosphatase (ALP)와 조직의 세포에 존재하여 아미노산을 세포내로 운송하는 효소인 Gamma(γ)-glutamyl transferase (GGT)는 인체에서 약물로 인한 간장

손상 시 증가하는 것으로 알려져 있으나 (김 등, 2004), 본 실험에서는 이에 대해 유의한 변화를 관찰할 수 없었다.

Thioacetamide(TAA)는 알려진 메커니즘에 따르면 칼슘이온의 흡수를 방해함으로써 칼슘이온의 농도를 증가시키게 되고, 미토콘드리아의 기능을 억제하여 ROS 를 발생시키게 되며, 주로 간장에서 독성을 일으키는 것으로 알려져 있지만 (Bruck et al., 2004; Hajovsky et al., 2012; Akhtar et al., 2013; Ihegboro et al., 2022), 실험 결과로 TAA 로 인한 간장 병변은 나타나지 않았다. 이전 연구에 따르면 간장은 체내 항상성을 유지하고 해독작용을 하며, 혈장 단백질 생성의 기능 등을 가지며 (Hibiya et al., 1982), 이로 인해 간을 면역 장기, 대사 장기로 제시되고 있는데 (Sheth et al., 2001; Meli et al., 2014) , 본 연구에서 사용한 실험어류는 양식 현장에서 시료를 획득할 때부터 지방간이 만연해 있었고, 지방간으로 인해 구조와 기능이 손상된 간장은 저산소성 간세포의 기능 손상이 나타나고 있던 중에 TAA 라는 독성물질을 투여하여 TAA 독성에 의한 병변의 변화를 구분할 수 없었다.

임상검사 및 조직병리학적 분석을 통해 IPT 군에서 TAA 로 인한 간장외막의 출혈은 확인할 수 있었으나, 조직상으로 간세포 실질 내까지 이어지는 출혈 및 염증성 병변은 확인할 수 없었다.

반면, TAA 주사 후, Blood urea nitrogen (BUN) 수치는 IMT 군에서 유의미하게 감소하였다가 7 일 차에 증가하였고, IPT 군에서는 5 일 차에 유의미하게 증가하였으며, Creatinine (CREA)은 IMT 군에서 주사 후 5 일 차에 유의미하게 증가하였고, IPT 군에서 주사 후 7 일 차에 유의미하게 증가하였다. 보통 BUN 과 Creatinine 항목은 신장 기능 평가를 위한 마커로 사용되며, 급성 세뇨관 손상이 나타날 때 BUN 및 Creatinine 수치는 상승한다 (Erdem et al., 2000). BUN 의 감소는 유의성을 나타냈으나, 임상적으로 큰 의의는 없는 것으로 알려져 있다 (이 등, 2015).

체신의 조직병리학적 검사 결과, IMT 군과 IPT 군 모두 3 일 차부터 세뇨관 상피에서 공포가 관찰되었고, 5 일 차에 세뇨관 상피세포에서 apoptotic cell 이 관찰되어 세포자멸사를 확인할 수 있었으며, 핵이 응축(pyknosis)되어 괴사하는 형태도

나타났다. 세노관 상피 피사의 경우 7 일 차까지 이어지는 것으로 관찰되었다. 이러한 조직학적 변화들은 이전에 연구된 랫트에 TAA 투여 시 나타나는 조직학적 변화 (Barker and Smuckler, 1974) 와 일치하는 것으로 보인다.

Barker and Smuckler 에 따르면, 본 실험결과와 같이 TAA 고농도 투여 시 혈류를 따라 TAA 가 간장을 통과할 수도 있으며, 신장에서는 사구체를 통과한 후 세노관 손상을 일으킬 수 있는 것으로 보고되어 있다.

양식 강도다리에서 독성물질인 TAA 로 인한 간장의 조직변화는 확인할 수 없었으나, 체신의 조직변화를 관찰함으로써 독성물질로 인해 나타나는 세노관 병변의 일련의 과정을 확인할 수 있었다.

이미 현재 양식 현장에서는 사육어류의 과다급이가 만연하며 이는 지방간을 유발하는 것으로 알려져 있어 (이, 2008; 이, 2008; Taddese et al., 2014), 정상간장을 보유한 실험어류를 구하기 어려울 것으로 보이나 실험어류의 지방간 유무에 따른 TAA 의 영향을 비교하는 연구가 추가적으로

진행된다면, 어류 독성 모델 활용 부분에 있어서 좋은 기반이
될 것이라고 사료된다.



V. 요약

수의학에서는 병리 독성 모델 연구를 활용하여 항산화 물질의 효과를 확인하는 연구가 진행되고 있으며, 특정 물질의 간장 또는 신장 독성 완화 효과를 확인하기 위해 활용되기도 한다. 국내 양식어류에 대한 독성 모델의 연구가 필요하다고 생각되어, 최근 양식 생산량이 증가하고 있는 강도다리(*Platichthys stellatus*)에 대하여 미토콘드리아의 기능장애를 일으켜 산화 스트레스 유발하는 독성 물질인 thioacetamide(TAA) 주사 후 그에 따른 영향을 관찰하였다.

TAA 300mg/kg을 근육내 주사 및 복강내 주사하여 1,3,5,7일 후에 샘플링하였다. 그 결과, 혈액생화학적 분석에서는 근육내주사 및 복강내주사 1일 뒤에 간의 미토콘드리아와 관련된 GOT 수치가 증가하였고, TAA 주사 5일, 7일 뒤에 신장 기능과 관련된 BUN, Creatinine이 유의미하게 변했다. 조직병리학적 분석에서는 TAA 주사 3일 후부터 7일 후까지 세뇨관 공포화, 세뇨관 상피 자멸사, 세뇨관 상피 괴사 등의 급성 세뇨관 손상이 나타났으며 이에 대한 병변을 관찰할 수 있었다. TAA의 복

강내 주사 시 간장외막에 출혈 및 염증, 괴사 소견이 나타났으나, 간세포 실질 내 유의미한 병변은 나타나지 않았다. 본 연구는 간장의 손상에 대해서는 조직병리학적 영향을 확인하지 못했지만 신장의 손상에 대해서 확인하였기 때문에 추후 신장 독성을 활용한 연구에 이바지할 수 있을 것이라 사료된다.



감사의 글

졸업 논문을 작성하기까지 많은 우여곡절이 있었으나, 많은 분들의 격려와 조언으로 이렇게 무사히 졸업 논문을 마치게 되어 감사 인사를 드리고자 합니다.

석사과정동안 항상 부족했던 저에게 진정한 학문의 목적을 가르쳐 주시고 사람됨을 일깨워 주신 허민도 교수님, 논문심사를 통해 더 나은 논문을 작성하도록 조언해주신 정준기 교수님, 김광일 교수님께 감사 인사 드립니다. 또한 저의 학부과정과 실험실 생활에서 많은 가르침을 주셨던 정현도 교수님, 여러 수업 속에서 조언을 아끼지 않으셨던 김기홍 교수님, 김도형 교수님, 강주찬 교수님께도 감사 인사를 드립니다.

석사과정을 마무리하고 있음에도 불구하고 여전히 병리학의 길은 어렵고 공부할 게 많지만, 그러한 저에게 많은 도움을 주시고 늘 새로운 지식을 알려주시는 이무근 선배님, 그리고 멀리서도 진심 어린 걱정과 함께 연락 주셨던 김보성 선배님께 감사한 마음을 전합니다. 저의 연구에 대하여 같이 고민해주고

조언해주던 우리 노을빛 연구원과 같이 석사과정을 마무리하게
된 박종남 선배에게도 감사드립니다.

수산생명의학과 대학원 생활 속에서 마주했던 모든
대학원생분들께도 고마운 마음과 응원을 전합니다.

마지막으로 제가 힘들 때마다 다시 일어설 힘이 되어 주신
부모님께 감사 인사를 올립니다.



참고문헌

- 김진배, 손주현, 이항락, 김종표, 한동수, 함준수, ... & 기춘석. (2004). 급성 독성 간손상의 임상적 양상. 대한간학회지, 10(2), 125-34.
- 수산정보통계포털, 2020-2021 년 어업 품종별 생산량
- 이기욱, 한경식, 임현정, & 변순규. (2021). 사육수온이 강도다리 치어의 성장에 미치는 영향. 수산해양교육연구, 33(2), 515-524.
- 이무근. (2008). 양식 송어 녹간증에 대한 병리학적 연구, 학위논문.
- 이한나. (2008). 원적외선 활성수가 조피볼락 (*Sebastes schlegeli*)의 자연발생된 지방간 예에 미치는 병리조직학적 영향, 학위논문
- 이귀녕 & 문해란, 2015, 임상진단검사 활용 및 해석, 1, 고려의학
- 주혜림, & 노원상. (2017). 간암 동물모델의 현황 및 전임상 연구에서의 활용. Journal of Liver Cancer (대한간암학회지), 17(1), 1-14.
- 최재혁, 정상목, 강인성, & 최상훈. (2020). Taurine-F TM 의 근육 주사가 넙치의 간 독성 완화와 선천성 면역에 미치는 효과. 한국어병학회지, 33(1), 83-89.

- Akhtar, T., & Sheikh, N. (2013). An overview of thioacetamide-induced hepatotoxicity. *Toxin Reviews*, 32(3), 43-46.
- Barker, E. A., & Smuckler, E. A. (1974). Nonhepatic thioacetamide injury: II. The morphologic features of proximal renal tubular injury. *The American Journal of Pathology*, 74(3), 575.
- Bhakuni, G. S., Bedi, O., Bariwal, J., Deshmukh, R., & Kumar, P. (2016). Animal models of hepatotoxicity. *Inflammation Research*, 65(1), 13-24.
- Bruck, R, Aeed, H, Avni, Y. (2004) Melatonin inhibits nuclear factor kappa B activation and oxidative stress and protects against thioacetamide induced liver damage in rats. *Journal of Hepatology* 40: 86-93.
- Chyung, M.K.(1977). *The Fishes of Korea*, Iljisa, 570pp. Seoul, Korea, .
- Cho, M.Y., Lee, J.I., Kim, M.S., Choi, H.J., Lee, D.C.and Kim, J.W.(2008). Isolation of *Streptococcus parauberis* from starry flounder, *Platichthys stellatus* Pallas. *J. Fish Pathol.*, 21:209-217.
- Erdem, A., Gündogan, N. Ü., Usubütün, A., Kılınç, K., Erdem, Ş. R., Kara, A., & Bozkurt, A. (2000). The protective effect of taurine against gentamicin-induced acute

tubular necrosis in rats. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 15(8), 1175–1182.

Ghosh, S., Sarkar, A., Bhattacharyya, S., & Sil, P. C. (2016). Silymarin protects mouse liver and kidney from thioacetamide induced toxicity by scavenging reactive oxygen species and activating PI3K–Akt pathway. *Frontiers in pharmacology*, 7, 481.

Hajovsky, H., Hu, G., Koen, Y., Sarma, D., Cui, W., Moore, D. S., ... & Hanzlik, R. P. (2012). Metabolism and toxicity of thioacetamide and thioacetamide S–oxide in rat hepatocytes. *Chemical research in toxicology*, 25(9), 1955–1963.

Hibiya, T. (1982). *Atlas of fish histology*. Kodansha.

Ihegboro, G. O., & Ononamadu, C. J. (2022). Drug–Induced Hepatotoxicity.

Iqbal, F., Qureshi, I. Z., & Ali, M. (2004). Histopathological changes in the kidney of common carp, *Cyprinus carpio* following nitrate exposure. *J. Res. Sci*, 15(4), 411–418.

Javed, M., Ahmad, M., Usmani, N., & Ahmad, M. (2017). Multiple biomarker responses (serum biochemistry, oxidative stress, genotoxicity and histopathology) in *Channa punctatus* exposed to heavy metal loaded waste water. *Scientific reports*, 7(1), 1–11.

- Kim, S.K., Shim, N.Y., Jang, I.K., Lee, C., Kim, Y.D., Kim, B.G., & Kim, J.W. (2013). Physiological and Histological Characteristics of Starry Flounder *Platichthys stellatus* after Starvation and Re-feeding. Korean Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 46(6), 793–800.
- Lee, Y. S., Cho, Y. K., Pae, J. C., Oh, S. Y., & Kang, M. S. (2006). The Relationship Between Serum Adiponectin Level and Serum Alanine Aminotransferase Elevation in Korean Male with Nonalcoholic Fatty Liver Disease. The Korean Journal of Hepatology, 12(2), 221–229.
- Lim, H. K., Byun, S. G., Lee, J. H., Park, S. U., Kim, Y. C., Han, H. K., ... & Lee, B. Y. (2007). Sexual maturity and reproductive cycle of starry flounder *Platichthys stellatus* cultured in indoor tank. Journal of Aquaculture, 20(4), 212–218.
- Mandal, A. K., Lansing, M., & Fahmy, A. (1982). Acute tubular necrosis in hepatorenal syndrome: an electron microscopy study. American Journal of Kidney Diseases, 2(3), 363–374.
- Meli, R., Mattace Raso, G., & Calignano, A. (2014). Role of innate immune response in non-alcoholic fatty liver disease: metabolic complications and therapeutic tools. Frontiers in immunology, 5, 177.

- Min, E., Jeong, J. W., & Kang, J. C. (2014). Thermal effects on antioxidant enzymes response in *Tilapia, Oreochromis niloticus* exposed Arsenic. *Journal of fish pathology*, 27(2), 115-125.
- Myers, M. S., Stehr, C. M., Olson, O. P., Johnson, L. L., McCain, B. B., Chan, S. L., & Varanasi, U. (1994). Relationships between toxicopathic hepatic lesions and exposure to chemical contaminants in English sole (*Pleuronectes vetulus*), starry flounder (*Platichthys stellatus*), and white croaker (*Genyonemus lineatus*) from selected marine sites on the Pacific Coast, USA. *Environmental Health Perspectives*, 102(2), 200-215.
- Ogura, S., & Shimosawa, T. (2014). Oxidative stress and organ damages. *Current Hypertension Reports*, 16(8), 1-5.
- Park, H. J., Hwang, I. K., Kim, K. W., Kim, J. H., & Kang, J. C. (2018). Toxic effects and depuration on the antioxidant and neurotransmitter responses after dietary lead exposure in Starry Flounder. *Journal of Aquatic Animal Health*, 30(4), 245-252.
- Pierce, K. V., McCain, B. B., & Wellings, S. R. (1980). Histopathology of abnormal livers and other organs of starry flounder *Platichthys stellatus* (Pallas) from the estuary of the Duwamish River, Seattle,

Washington, USA. *Journal of fish diseases*, 3(2), 81–91.

Rekha, R. D., Amali, A. A., Her, G. M., Yeh, Y. H., Gong, H. Y., Hu, S. Y., ... & Wu, J. L. (2008). Thioacetamide accelerates steatohepatitis, cirrhosis and HCC by expressing HCV core protein in transgenic zebrafish *Danio rerio*. *Toxicology*, 243(1–2), 11–22.

Sasaki, D., Yamada, A., Umeno, H., Kurihara, H., Nakatsuji, S., Fujihira, S., ... & Seki, J. (2011). Comparison of the course of biomarker changes and kidney injury in a rat model of drug-induced acute kidney injury. *Biomarkers*, 16(7), 553–566.

Sheth, K., & Bankey, P. (2001). The liver as an immune organ. *Current opinion in critical care*, 7(2), 99–104.

Silver, Sam & Cardinal, Héloïse & Colwell, Katelyn & Burger, Dylan & Dickhout, Jeffrey. (2015). Acute Kidney Injury: Preclinical Innovations, Challenges, and Opportunities for Translation. *Canadian journal of kidney health and disease*. 2. 30. 10.1186/s40697-015-0062-9.

Taddese, F., Huh, M. D., Bai, S. C., & Vijverberg, J. (2014). Histological changes of liver in overfed young Nile tilapia. *Journal of Fisheries and Aquatic Science*, 9(2), 63–74.

Ventura-Lima, J., de Castro, M. R., Acosta, D., Fattorini, D., Regoli, F., de Carvalho, L. M., ... & Monserrat, J. M. (2009). Effects of arsenic (As) exposure on the antioxidant status of gills of the zebrafish *Danio rerio* (Cyprinidae). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 149(4), 538–543.

Yang, J., Li, Y., Wang, F., & Wu, C. (2010). Hepatoprotective effects of apple polyphenols on CCl₄-induced acute liver damage in mice. *Journal of agricultural and food chemistry*, 58(10), 6525–6531.

