

## Amprolium hydrochloride가 넓치 *Paralichthys olivaceus*의 약물대사 유전자 발현에 미치는 영향

박상협\* · 김창환\* · 도정완\*\*\* · 최혜승\*\*\* · 김이경\*,\*\*†

\*강릉원주대학교 수산생명의학과

\*\*강릉원주대학교 동해안생명과학연구원

\*\*\*국립수산과학원 병리연구과

### Effects of amprolium hydrochloride on expression of drug metabolizing enzyme genes in olive flounder *Paralichthys olivaceus*

Sang Hyup Park\*, Chang Han Kim\*, Jeong-wan Do\*\*\*,  
Hye-Sung Choi\*\*\* and Yi Kyung Kim\*,\*\*†

\*Department of Aquatic Life Medicine, Gangneung-Wonju National University, Gangneung 25457, Korea

\*\*The East Coast Research Institute of Life Science, Gangneung-Wonju National University,  
Gangneung 25457, South Korea

\*\*\*Pathology Division, National Institute of Fisheries Science, Busan 46083, Korea

This study was undertaken to evaluate the effect of amprolium hydrochloride on detoxification process of olive flounder *Paralichthys olivaceus*. A series of two experiment was performed based on the LD<sub>50</sub> value obtained for amprolium. First, thirty flounder (average weight 230.27 g; average length 27.99 cm) was randomly allocated into five groups. Treatment was carried out using intramuscular injection of amprolium at the dose levels of 4, 8, 16, and 32 mg/kg body weight. At 8, 24 and 48 h post injection, liver and kidney were collected for expression assay of drug metabolizing enzymes and pro-inflammatory cytokine genes. We found that the interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) mRNA level were induced at 32 mg/kg and CYP1A genes showed the opposite pattern, while UDP-glucuronosyl-transferase (UGT1A7) and GST were significantly reduced in the liver. Moreover, the suppression of drug metabolizing enzymes and cytokine gene in the kidney was observed after treatment. Another treatment was carried out using intramuscular injection with 4, 8, 16, and 32 mg/kg and 60, 80, 100, 120 mg/kg body weight. At 6 days post injection, liver was collected. The IL-1 $\beta$  expression was markedly induced in the experimental group treated with 4 mg/kg. In addition, glutathione S-transferase (GST) mRNA level was higher in the group with 4 mg/kg. In conclusion, our data suggests that amprolium seem to cause direct or indirect physical, or biological toxicity of flounders, although this drug is considered one of the safest synthetic anticoccidial drugs of the livestock industry.

**Key words:** *Paralichthys olivaceus*, amprolium hydrochloride, drug metabolizing enzymes

†Corresponding author: Yi Kyung Kim  
Tel: +82-33-640-2409, Fax: +82-33-640-2955  
E-mail: yikyung1118@gwnu.ac.kr

## 서 론

자연에 서식하는 생물체는 외부환경으로부터 직접적으로 혹은 간접적으로 합성된 생체이물질(xenobiotics)에 끊임없이 노출되고 있다. 체내로 흡수된 생체이물질은 물리적 성질의 변화로 인하여 체외로의 배설이 어려워지고 체내에 여러가지 영향을 미치게 된다(Gunaratna, 2000). 이에 대하여 체내 항상성을 유지하기 위한 방어기전 중 하나로 약물의 생체반응을 종결시키거나 변화시키는 경로가 대사과정, 즉 생체전환(biotransformation)과정이다. 일반적으로 약물을 포함한 생체 외부에서 유입된 물질은 Phase I과 Phase II 반응을 거치게 된다. Phase I반응은 산화(oxidation), 환원(reduction), 가수분해(hydrolysis) 등의 반응을 통해 분자내 친수성 관능기(functional group; -OH, -SH, -NH<sub>2</sub>, -COOH 등)를 첨가하여 물질의 극성(polarity)를 증가시킨다(Gunaratna, 2000; Taxak and Bharatam, 2014; Gudín and Fudin, 2020). I상 대사의 주요 효소계는 cytochrome P450 (CYP) enzymes이며, 주로 monooxygenase, dioxygenase, hydrolases로 작용하여 hydroxylation반응을 일으킨다(Gunaratna, 2000). Phase II 반응에서는 I상 대사로 산화된 중간대사체(metabolites)에 분자량이 작고 친수성의 내인성 물질 즉 glucuronic acid, sulfate, glutathione, cysteine 혹은 acetate 등을 결합(conjugate)시켜 수용성이 더 증가된 대사체로 배설을 용이하게 한다. II 상 대사 효소계로는 glutathione transferase, UDP-glucuronosyl-transferase와 N-acetyltransferase가 있다. 이외에도 III상 대사가 최근에 밝혀졌으며 세포막 배설과정으로 P-glycoprotein이 대표적이다.

쿠도아(Kudoa)속 점액포자충은 대부분 해산어의 체근육, 장, 심장, 뇌조직에 기생한다(Yokoyama, 2016). 방어의 근육에 기생하는 *Kudoa amamiensis* 및 *K. iwatai*는 다수의 시스템을 형성하거나, *K. thyrsites*, *K. clupeiidae* 등은 대서양연어(*Salmo salar*), 넙치에 기생하고 어류가 죽은 후에 기생충의 단백질 분해효소에 의한 근육 용해를 일으키므로써 상품가치를 하락시켜 경제적인 피해를 일으킨다(Yokoyama et al., 2004; Sitjà-Bobadilla, 2009; Grabner et al., 2012). 최근 보고된 *K. septempunctata*

는 5-7개의 극낭을 가진 포자(spore) 형태로 근육섬유에 분포하면서 숙주어종이 넙치에 국한되어, 시스템 형성이나 근육용해 등의 병적증상이 관찰되지 않고 폐사를 일으키지 않으므로 감염어를 선별하는 것이 매우 어렵다(Yokoyama et al., 2012). *K. septempunctata*는 미토콘드리아 게놈과 nucleic genome을 가지고 있으며, 미토콘드리아 게놈에는 5개의 단백질유전자만을 가지고 있다. 이러한 쿠도아충은 2011년 일본에서 식중독의 새로운 원인물질로 분류되어 일본에서는 한국에서 수입되는 넙치에 대해서 넙치 근육의 1g 당 포자의수가 10<sup>6</sup>개 이상이 되는 경우 식중독을 일으키는 양성 기준으로 지정되었다(Matsukane et al., 2010). 현재까지 넙치의 쿠도아 감염을 억제하거나 감염된 넙치에서 *K. septempunctata*의 생존을 억제하거나 사멸시키는 용도로 사용된 약물은 없었으며, 시판 중인 동물용 항콕시딕제 톨트라주릴과 amprolium의 쿠도아충에 대한 *in vitro* 실험이 보고되었으며, 최근 녹차의 epigallocatechin gallate가 쿠도아충의 포자를 손상시킨다는 연구 내용이 발표되었다(Ahn et al., 2017; Shin et al., 2020).

Amprolium은 thiamine의 능동적인 수송을 경쟁적으로 방해하는 thiamine analogue로서 탄수화물 합성을 억제하여 세포대사가 저해된다(Duszynski et al., 2018). Amprolium은 경구투여시 효과적이며 Rats에서 amprolium을 경구투여한 후 몇 시간 이내에 약 82% 이상 faces형태로 배출되고 약 9.6%은 urine형태로 배출이 되고 잔류량은 간을 비롯한 조직에 넓게 분포한다. 특히 콕시디움증 치료제 중에서도 부작용이 없고 가장 안전한 약품 중 하나로 인식되고 있다(Pandey, 2013; Duszynski et al., 2018). 경구투여된 후에는 신장을 통해 몇 시간 이내에 신속하게 배출되는 것으로 알려져 있다. Rat의 경우 amprolium을 반복적으로 경구투여한 실험에서 투여 종료 후 24시간 이내 간에서 8개, 신장에서 16개의 비동정 대사체(unidentified metabolites)가 존재하였다(EMA, 1999). Ahn et al. (2017) 에 의하면 *K. septempunctata* genotype ST3에 대해 고농도의 amprolium 처리군(920 µg/mL)에서의 포자 생존력은 대조군의 18%, 동일한 고농도의 톨트라주릴 처리군에서는 대조군의 83%로 나타났다. 이에 am-

prolium이 쿠도아충 치료제로서 개발 가능성을 제시하였다.

생체내로 유입된 약물을 포함한 외인성물질들은 간조직의 대사효소에 의해 생체변형을 거치게 된다. 이들 효소는 체내로 유입된 생체이물질의 수용성을 증가시켜 체외배설이 용이한 형태로 전환시키거나 혹은 이들 효소의 발현변화는 약물의 부작용 혹은 독성영향과 관련된다(Hodgson and Levi, 1994). 가금류에서 널리 사용되고 있는 amprolium을 수산생물 치료제로 활용하기 위해 안전성 검증을 위한 구체적인 독성시험 연구가 필요하다. 본 연구는 이전에 실시한 단회투여 급성독성시험을 기반으로 넙치에 반복투여하여 대표적인 약물대사효소인 제1상 반응 주요효소 cytochrome P450, family 1, subfamily A, polypeptide (CYP1A)와, 제2상반응 효소인 UDP-glucuronosyltransferase 1 family, polypeptide A7 (UGT1A7) 및 glutathione S-transferase (GST) 그리고 선천적 면역반응을 나타내는 인자로서 전염증성 사이토카인interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) 유전자의 발현분석을 통하여 amprolium이 넙치의 조직에 미치는 영향을 조사하고 쿠도아충 구제제로서의 가능성을 검토하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 실험물질

본 연구에서 사용된 amprolium hydrochloride (C<sub>14</sub>H<sub>19</sub>N<sub>4</sub>Cl · HCl, Purity  $\geq$  98%)은 Sigma Aldrich사 (St. Louis, MO, USA)에서 구매하였다. 실험물질을 투여하기 전날에 phosphate buffered saline (PBS; GenDEPOT, Korea)을 사용하여 필요한 농도로 희석하였다.

### 실험어 및 사육환경

본 실험에서 사용된 넙치는 충청남도 태안에 위치한 개인 양식장에서 구입하여 강릉원주대학교 해양과학교육원으로 운송하여 수조환경(7.5 ton, 유수식)에 적응시켰다. 실험을 시작하기 전 무작위로 선별한 넙치개체에서 세균 및 바이러스 검사를 통하여 감염여부를 확인하고 실험을 진행하였다. 실험에 사용할 넙치(체중, 167.87  $\pm$  24.70 g; 체장,

25.92  $\pm$  1.45 cm)를 무게를 측정 후 실험시작 2주 전에 수온 200 L 순환여과식 수조로 옮겨 사육하였다. 순환여과식 사육수의 평균수온은 21  $\pm$  0.24  $^{\circ}$ C으로 유지되었으며, 광주기 조건은 자연광에 의존하였다. 실험사료(Suhyup, Korea)는 어체중의 1%로 1일 1회 공급하였다. 본 실험은 강릉원주대학교 동물실험윤리위원회(Institutional Animal Care and Use Committee)의 승인하에 실시하였다(Approval No. GWNU-2022-8).

## Experimental protocol

### 1) Experiment I

Amprolium 투여직후의 넙치 체내 염증과 약물대사 유전자 발현을 검토하기 위하여 시험군은 넙치 100마리를 각 실험군당 20마리씩 총 5개군으로 무작위로 나누어 분배하였다. 투여용량은 문헌조사 및 이전 보고된 급성독성시험의 LD<sub>50</sub> (amprolium LD<sub>50</sub>, 148.18 mg/kg; Park et al., 2023) 값의 1/5 정도를 최고용량으로 하여 4, 8, 16, 32 mg/kg 구간으로 정하였다(Shin, 1997). 시험물질의 투여경로는 주사투여로 실시하고, 투여방법은 100  $\mu$ l 주사액을 넙치의 복강 주변 근육 2곳에 나누어 1 ml 주사기(KOVAX, Seoul, Korea)로 투여하였다. 1일 1회 총 3일간 투여하였으며, 투여 종료한 후 8, 24, 48시간째 넙치의 간과 신장을 적출하여 다음 분석시까지 초저온 냉동고(-80  $^{\circ}$ C)에 보관하였다. 대조군에는 시험물질투여군과 동량의 PBS를 투여하였다.

### 2) Experiment II

amprolium 투여 종료 6일후의 유전자 발현을 검토하여 위하여 상기와 동일하게 넙치를 20마리씩 총 5개군으로 무작위로 나누어 분배하였다. 투여용량은 (1) LD<sub>50</sub>값의 1/5정도로 최고용량으로 설정한 4, 8, 16, 32 mg/kg 농도구간과 (2)임상반응의 시작용량을 마우스의 LD<sub>10</sub>값으로 하는 FDA 가이드라인에 준하여 60, 80, 100, 120 mg/kg [amprolium LD<sub>10</sub>값, 103.053 mg/kg]으로 설정하여 실험을 진행하였다(Cook et al., 2015; Park et al., 2023). 상기와 같은 방법으로 3일 동안 주사투여한 후 주사투여 종료 후 6일차 넙치의 간조직을 적출하여 다음 분석시까지 초저온 냉동고에 보관하였다. 대조군에

는 시험물질투여군과 동량의 PBS를 투여하였다.

#### Real-time PCR analysis

본 연구에서는 쿠도아충 구제후보물질인 amprolium을 넙치에 주사투여한 후 간 혹은 신장 조직에서의 면역반응과 임상1상반응 산화효소계 및 임상 2상 포함효소의 발현에 미치는 효과를 조사하여 real-time PCR법을 진행하였다. 넙치에서 적출된 간 혹은 신장조직에서 RNAiso Reagent (Takara Bio, Shiga, Japan)을 이용하여 total RNA를 추출한 후 Nanodrop ND-2000 (Thermo Scientific, Waltham, USA) 분광광도계를 사용하여 total RNA 양을 정량하였다. cDNA 합성은 PrimeScript RT reagent kit (Takara)을 사용하여 제조자의 매뉴얼에 따라 RNA 역전사 반응을 진행하였다. PCR을 수행하기 위한 primer 정보는 Table 1에 나타내었다.

지표로 선정된 유전자의 발현양상을 분석하기 위해서 Thermal Cycler Dice™ real-time PCR system (Takara)과 SYBR premix ExTaq II Kit (Takara)을 사용하였다. PCR을 수행하기 위한 primer 정보는 Table 1에 나타내었다. Real-time PCR 조건은 초기 변성으로 95 °C 30초간 1 cycle, 이어서 95 °C에서 5초, 60 °C에서 30초를 45 cycles로 수행하였다.

각 유전자의 상대적 정량값은 Livak and Schmittgen (2001)이 제시한  $2^{-\Delta\Delta CT}$  방법으로 분석하였다. 유전자의 상대적 발현량을 계산하기 위해 Elongation factor 1 (EF1)를 reference gene로 사용하였다.

#### 통계분석

실험결과는 mean ± standard error (SEM)로 나타냈으며 SPSS 25.0 software (SAS Inc., Cary, NC, USA)을 이용하여 one-way ANOVA를 실시한 후 Tukey HSD test로 그룹 평균 간의 유의성( $P < 0.05$ )을 사후검정 하였다.

## 결 과

#### Amprolium 투여 후 간 및 신장조직에서 약물대사 유전자 mRNA발현

Amprolium의 독성을 검토하기 위해서 이전 연구에서 확보한 넙치의 amprolium에 대한 LD<sub>50</sub>의 1/5값 기준으로 설정한 농도구간[4, 8, 16, 32 mg/kg]으로 하루 1회 3일동안 연속주사하고 투여 종료 후 8, 24, 48시간째 간과 신장에서 약물대사 지표유전자의 발현양을 검토하였다(Figs. 1 and 2). 간조직에서는 IL-1 $\beta$  유전자는 투여 후 8시간째 8 mg/kg 투여구간에서 발현양이 2.02배 증가하였고, 24시간과 48 시간에서는 가장 높은 농도인 32 mg/kg 구간에서만 2.86 및 2.47배 유의적인 증가를 나타내었다. CYP1A1 유전자는 투여 후 8시간에서 16 mg/kg을 제외한 농도구간에서 대조구에 대비 4.58, 5.43, 4.81배 유의적인 증가를 나타내었으나, 24시간부터는 투여농도 구간에서는 전체적으로 감소하였고, 48시간에서는 대조구와 유의적인 차이를 나타내지 않았다. 약물대사 제2상 반응 유전자 모두 대조구에 비해서 모든 농도구간에서 유의

Table 1. Primer used in this study

Gene	Full name	Sequence (5'-3')	Reference
EF1 $\alpha$	Elongation factor 1 $\alpha$	F: CGTGAGCGTGGTATCACCAT R: AGCCGATCTTCTTGATGTAG	AB915949.1
IL-1 $\beta$	Interleukin-1 $\beta$	F: GACAGTGAGATGGTGCGATTTC R: ACCATCACTGGCCTGTTGTCT	Hur et al., 2013
CYP1A	Cytochrome P450, family 1, subfamily A, polypeptide	F: GACTTCATCCCTATCCTCCAGT R: CCTCTCCTGTATCTCTGGGTAAG	Jung et al., 2017
UGT1A7	UDP glucuronosyltransferase 1 family, polypeptide A7	F: CTCTAATGAGTCGAGTGAAGGG R: CATGAGTAGGACTCCACAACAG	Jung et al., 2017
GST	Glutathione S-transferase	F: TCTGTCTGGACCTGTGTACCTG R: GTTGGGAAAGTCTGAGAGGATGC	Cui et al., 2020

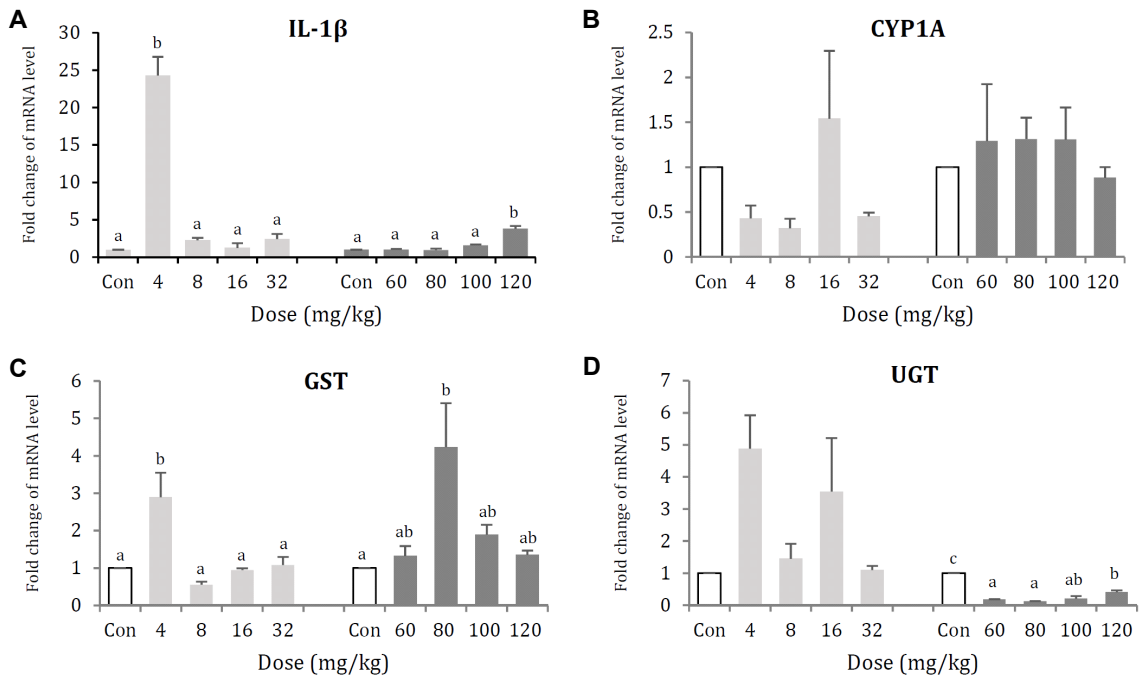


Fig. 1. Effect of amprolium hydrochloride on pro-inflammatory cytokine gene (A; IL-1 $\beta$ ) and drug metabolism genes (B; CYP1A, C; UGT1A7, D; GST) expression in olive flounder, *Paralichthys olivaceus*, at the various amprolium hydrochloride doses (4, 8, 16, 32, 60, 80, 100, 120 mg/kg) for three days. The level of IL-1 $\beta$  gene expression was quantified relative to EF1 $\alpha$ . Data represent mean  $\pm$  standard deviation (n = 20); means with the same or different letter are not significantly (p > 0.05) or are significantly (p < 0.05) different, respectively.

적으로 감소하였다. 특히 신장조직에서 4개의 지표유전자의 모든 구간에서 대조구에 비해 유의적으로 감소하였다.

#### Amprolium 투여 종료 후 6일 경과 후 다른 약물대사 유전자 발현

본 연구에서 amprolium 투여 종료 6일 경과후 넙치에 미치는 영향을 판단하기 위해서 immune-related gene인 IL-1 $\beta$ 를 검토하였다(Fig. 1). 먼저 농도구간[4, 8, 16, 32 mg/kg]를 넙치에 주사투여한 결과, 면역지표인 IL-1 $\beta$ 유전자는 4 mg/kg투여한 실험구간에서만 유의적으로 높은 수치를 나타내었으나, 다른 농도구간에서는 유의적인 차이를 나타내지 않았다. 한편 amprolium LD<sub>10</sub> 값을 기준으로 한 농도구간 [60, 80, 100, 120 mg/kg] 구간에서 IL-1 $\beta$ 유전자 발현은 120 mg/kg 구간에서만 유의적으로 증가하였다. 두 가지 농도구간의 발현 결과를 종합

하였을 때 대조구에 비해서 amprolium 4 mg/kg을 주사한 농도구간에서만 월등히 높은 수치(24.28 배)를 보였다.

본 연구에서는 amprolium을 주사투여한 후 3일 연속 주사투여한 후 6일차 샘플링한 간조직의 phase I 및 phase II 반응의 대사효소발현을 mRNA 수준에서 조사하였다(Fig. 1). Amprolium 농도구간 [4, 8, 16, 32 mg/kg]에서는 제1상 및 2상 반응효소인 CYP1A 및 UGT1A7 유전자 발현은 실험구간동안 유의적인 변화를 나타내지 않았다. 제2상 반응효소인 GST 유전자는 대조구에 비해 4 mg/kg에서 유의적으로 2.89배 증가하였으나, 8 mg/kg농도구간 이후로 대조구와 유의적인 차이를 나타내지 않았다. Amprolium [60, 80, 100, 120 mg/kg]구간에서는 CYP1A1 유전자 발현은 실험구간동안 유의적인 변화를 나타내지 않았다. GST 유전자만 80 mg/kg 농도구간에서 대조구에 비해 10.78배 증가하였

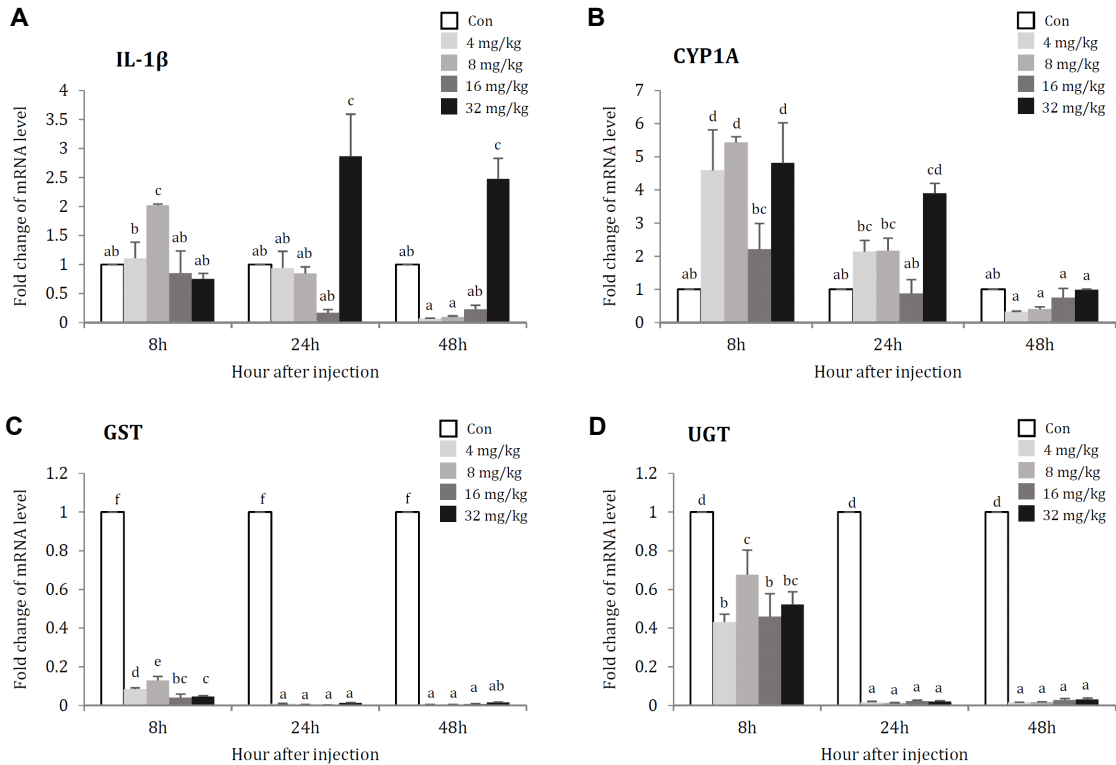


Fig. 2. Time-dependent (8, 24, 48 hours) pro-inflammatory cytokine gene (A) and drug metabolism gene (B, C, D) expression of olive flounder in the liver after the intramuscular injection of various amprolium hydrochloride doses (4, 8, 16, 32 mg/kg). The level of each gene expression were quantified relative to EF1 $\alpha$ . Data represent mean  $\pm$  standard deviation (n = 20); means with the same or different letter are not significantly (p > 0.05) or are significantly (p < 0.05) different, respectively.

으며, 다른 구간에서는 유의적인 차이를 나타내지 않았다. UGT 유전자는 약물투여구간[60, 80, 100, 120 mg/kg]에서는 대조구에 비해 모든 농도구간에서 약 0.12-0.4배 유의적인 감소를 나타내었다.

### 고찰

본 연구는 이전 실시한 단회투여 급성독성시험을 기반으로 선택된 투여용량을 넘치에 반복투여하여 3가지의 약물대사효소 유전자 및 전염증성 사이토카인 IL-1 $\beta$  유전자의 발현분석을 통하여 amprolium이 넘치에 간 및 신장 조직에 미치는 영향을 분석하였다. Amprolium 투여종료 48시간까지의 생체 내 염증 및 약물대사 유전자 발현을 조사하였다. 간조직에서는 IL-1 $\beta$  발현은 24시간과 48

시간에서는 32 mg/kg 구간에서만 유의적인 증가를 나타내었다. 이에 반해 CYP1A1 유전자는 투여 후 8 시간째 16 mg/kg을 제외한 농도구간에서 발현 양은 증가하였다가 24 시간 이후로 감소하였다. 약물대사 제2상인자인 GST 및 UGT 유전자 모두 대조구에 비해서 모든 농도구간에서 유의적으로 감소하였다.

*In vitro* 와 *in vivo* 연구에 의하면 전염증성 사이토카인인 IL-6, IL-1 $\beta$  및 tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )에 의해 우선적으로 매개되는 급성염증 반응에서 간조직에서 CYP발현이 감소되며, 이로 인해 약물대사 및 제거(drug metabolism and clearance) 과정도 감소되었다(Ghezzi et al., 1986; Monshouwer et al., 1996; Sharma et al., 2008). 또한 돼지 간세포의 primary culture에서 IL-1 $\beta$  에 노출시키면

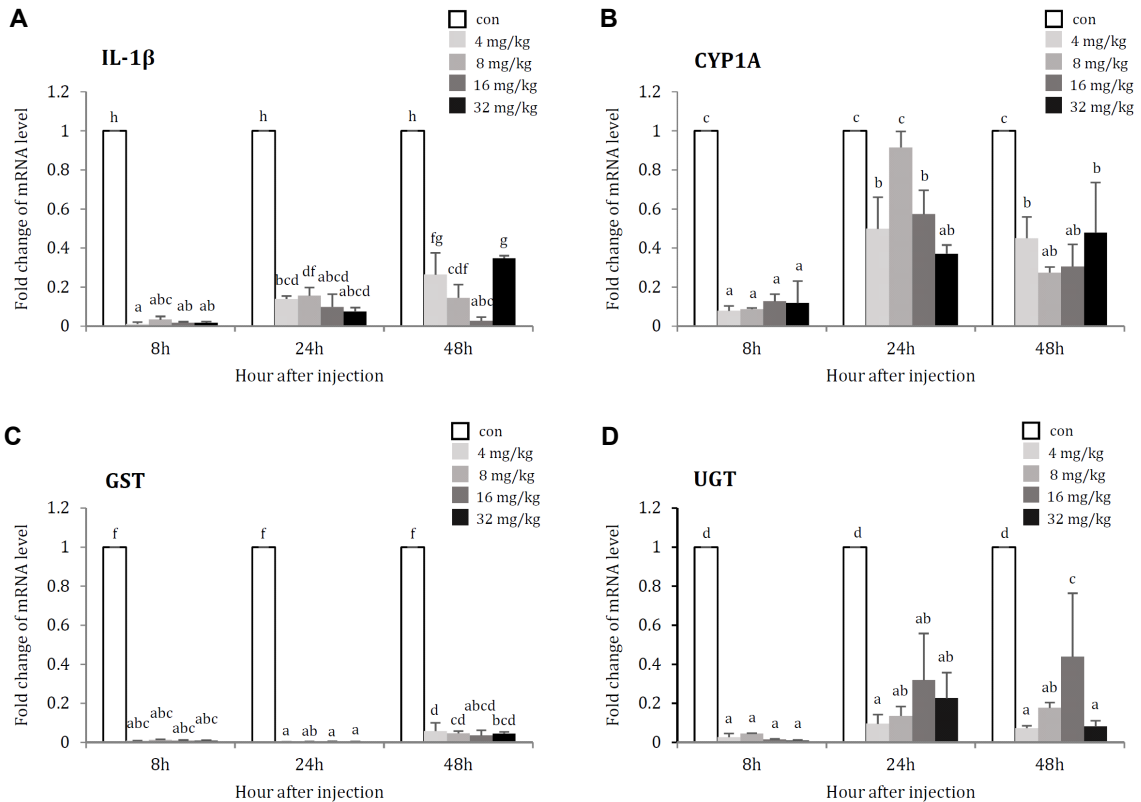


Fig. 3. Time-dependent (8, 24, 48 hours) pro-inflammatory cytokine gene (A) and drug metabolism gene (B, C, D) expression of olive flounder in the head kidney after the intramuscular injection of various amprolium hydrochloride doses (4, 8, 16, 32 mg/kg). The level of each gene expression were quantified relative to EF1 $\alpha$ . Data represent mean  $\pm$  standard deviation (n = 20); means with the same or different letter are not significantly (p > 0.05) or are significantly (p < 0.05) different, respectively.

CYP 및 UGT활성이 감소하였으며, 이는 IL-1 $\beta$ 에 의해 1상 CYP의 산화반응과 2상 효소인 UGT의 glucuronidation 포함반응 활성이 감소하는 것을 의미한다. GST은 glutathione을 다양한 친전자성 대사체(electrophilic derivatives)로 포함시키며 toxic and carcinogenic electrophiles 과 산화스트레스에 의해 생성되는 lipid hydroperoxides로부터 세포를 보호하는데 중요한 역할을 수행한다. Rat hepatocytes의 primary culture에서 IL-1 $\beta$ 에 노출된 GST 활성은 매우 현저하게 감소되었으며, GST mRNA 수준에서는 isoform에 따라 상승하거나 혹은 감소하는 결과를 나타내었다(Maheo et al., 1997).

신장조직에서는 4개의 생체 내 염증 및 약물대사 유전자 발현이 모든 구간에서 대조구에 비해

유의적으로 감소하였다(Fig. 3). 약물은 간이나 조직의 대사과정을 통해 수용성이 증가되고 독성은 저하되어 신장 또는 biliary excretion 등을 통해 많은 약물과 그 대사산물이 배출된다. 일부 약물은 대사과정을 통해서 약리 작용 또는 독성 작용이 있는 대사산물을 생성한다. 남과 체조제 농약인 파라콰트에 노출시킨 gold fish (*Carassius auratus*)에서 남과 농약의 노출농도 및 노출기간에 비례하여 GST 및 UGT 효소활성이 억제되었다(Xu et al., 2018.). Rat에 경구투여한 후 24시간이내 신장에서 간보다 많은 수의 대사체가 확인되었다. 신장은 간 조직과 마찬가지로 약물대사 메커니즘에 관련된 많은 유전자를 가지고 있으며, 신장질환은 약물대사를 감소시킨다. 신장의 질병 등의 신장기능 이상

으로 인해서 신장의 원래 기능인 unchanged drug의 제거와 간과 신장에서 metabolic transformation 과정을 변화시킬 수도 있다(Gibson, 1986). 본 연구에서는 이전보다 낮은 농도[4, 8, 16, 32 mg/kg]로 연속적인 반복투여를 하였을 때 모든 유전자 발현이 억제되었다는 것은 수용성 약물인 amprolium 혹은 대사체가 신장조직이 상당한 영향을 끼친 것으로 판단되며, 이전 연구에서 급성독성실험에서 신장의 부종소견이 관찰된 것도 이를 뒷받침하고 있다고 볼 수 있다.

본 연구에서는 amprolium을 3일 연속 주사투여한 후 6일차 샘플링한 간조직의 IL-1 $\beta$ , phase I 및 phase II 반응의 대사효소발현을 mRNA 수준에서 조사하였다. 먼저 면역지표인 IL-1 $\beta$ 유전자는 두 가지 농도구간의 발현양을 살펴보면 대조구에 비해서 amprolium 4 mg/kg을 주사한 농도구간에서만 월등히 높은 수치(24.28배)를 보였다. 대서양 대구 (*Gadus morhua*)에 불활성화 세균(formalin-killed *Vibrio anguillarum*)을 복강주사한지 24시간만에 비장 IL-1 $\beta$  mRNA는 804배 매우 가파른 증가된 발현양상을 보였고, heavy oil (10, 100, 200 mg/kg)을 경구투여한 조피볼락(*Sebastes schlegelii*)에서는 10 및 100 mg/kg 투여군의 간조직에서 매우 높은 IL-1 $\beta$  mRNA의 발현이 확인되었다(Seppola et al., 2008; Kim et al., 2013). 어류의 선천면역반응은 질병 혹은 외인성 물질자극에 의한 질병감수성(disease susceptibility)를 예측하기 위한 지표로서 이용된다(Zelikoff, 1998). 많은 지표 중에서도 interleukin (IL)은 어류 면역독성연구에서 빈번하게 사용되고(Rehberger et al., 2019), 염증반응과 세포손상의 sensor로서 염증반응과 조직손상을 조절하는데 중요한 역할을 수행한다(Ballak et al., 2015). 다양한 세포에서 생산되는 전염증성 사이토카인 IL-1 $\beta$ 는 감염 초기단계에 발현하며, 조직손상, 질병 및 다양한 면역반응에서 식세포 기능을 가진 호중구의 화학주성을 자극한다(Knaapen et al., 2002). 지나치게 활성화된 호중구는 세포손상의 원인이 되는 superoxide을 방출시키기 때문에 과도하게 유도된 IL-1 $\beta$ 는 어류의 간조직의 세포손상의 원인이 될 수 있다(Knaapen et al., 2002; Kim et al., 2013; Laforge et al., 2020). 이에 대한 자세한 경향을 확인

하기 위해서는 추가적인 연구가 필요할 것으로 판단된다.

Amprolium을 3일 연속 주사투여한 후 6일차 간조직의 phase I 및 phase II 반응의 대사효소발현을 mRNA 수준에서 조사하였다(Fig. 1). Amprolium 농도구간 [4, 8, 16, 32 mg/kg]에서는 제1상 및 2상 반응효소인 CYP1A 및 UGT1A7 유전자 발현은 실험구간동안 유의적인 변화를 나타내지 않았다. 제2상 반응 효소인 GST 유전자는 대조구에 비해 4 mg/kg구간에서만 유의적으로 2.89배 증가하였다가 농도구간 이후로 대조구와 유의적인 차이를 나타내지 않았다. Amprolium [60, 80, 100, 120 mg/kg] 구간에서는 CYP1A1 유전자 발현은 실험구간동안 유의적인 변화를 나타내지 않았다. GST 유전자만 80 mg/kg 농도구간에서 대조구에 비해 10.78배 증가하였으며, 다른 구간에서는 유의적인 차이를 나타내지 않았다. UGT 유전자는 약물투여구간[60, 80, 100, 120 mg/kg]에서는 대조구에 비해 모든 농도구간에서 약 0.12-0.4배 유의적인 감소를 나타내었다.

간의 해독과정 경로에서 Phase II에서는 생화학적 활성도를 낮추는 포합반응 등의 해독기전을 통해 Phase I 반응에서 생성된 중간대사산물을 수용성으로 최종 변환시켜 체외배설을 용이하게 한다(Jancova and Siller, 2012). Glutathione-S-transferases (GSTs)은 Phase II의 해독작용에 관여하는 대표적인 효소이며, 포유류 GSTs 유전자는 subunit 구조, 등전점(isoelectric points) 및 면역학적 특성을 기반으로 하여 크게 세 가지로 나뉜다: cytosolic GSTs (including seven classes, *Alpha*, *Mu*, *Pi*, *Theta*, *Sigma*, *Omega* and *Zeta*), mitochondrial GSTs (*Kappa* class) 및 microsomal GSTs (Higgins and Hayes, 2011; Mohana and Achary, 2017; Allocati et al., 2018). GST는 다양한 기능을 가지는데 특히 내인성 tripeptide glutathione (GSH) 및 친전자성 대사체(electrophilic derivatives)에 thioether conjugates를 결합시키므로써 해독화시키는 과정에 관여한다(Jancova et al., 2010). GSTs의 주요한 생물학적 기능으로는 미량금속 노출 혹은 정상적인 대사과정에서 발생할 수 있는 superoxide radical 와 hydrogen peroxide 와 같은 활성산소종(reactive oxygen spe-



cies)에 대응하는 세포학적 방어하는 기능을 가진다(Moreira and Guilhermino, 2005; Durou et al., 2007). 이 효소는 간에서 매우 높은 농도로 존재하므로 혈장 중의 효소활성을 측정하므로써 간 손상의 민감한 지표로 사용될 수 있다(Beckett and Hayes, 1993). 북어 river pufferfish (*Takifugu obscurus*)를 카드뮴(5 mg/L for 96 h)에 노출시켰을 때, 간 조직내의 GST genes (GST-MAPEG, GST-Mu, GST-Omega and GST-Zeta)는 노출 후 6시간부터 유의적으로 증가하였다. Sea bream의 경우에도 카드뮴 노출시 12-24시간 이내에 hepatic GST 유전자는 유의적인 증가를 나타내었다(Bouraoui et al., 2008). 중금속 노출과 ROS 생산으로 인해서 cytosolic GSH은 감소된다(George et al., 2000; Ghosh et al., 2001). 중금속노출로 인해 cytosolic GSH가 감소시키는 포합 반응을 촉매하는 GST 효소가 GSH를 생체이물과 포합시키는 반응을 유도하여 감소되므로, 이어서 GST발현은 유도된다. 중금속을 포함한 스트레스 요인에 대한 노출은 보호 기능이 있는 다양한 유전자를 증가하는 경향을 가진다(George et al., 2000). 따라서 넙치에 투여된 amprolium으로 인해 GSTs는 생체이물과 GSH의 포합기능을 촉매하고 이러한 촉매결합에 따른 cytosolic GSH 감소로 인해 이러한 유전자 발현의 증가로 이어진 것으로 판단된다.

GST와 함께 대표적인 제2상 약물대사 반응의 가장 중요한 대사효소인 UDP-glucuronosyltransferase (UGT)는 많은 약물을 비롯한 생체이물과 스테로이드호르몬을 포함한 다양한 외인성 물질과 내인성 물질의 해독화 과정에서 중요한 역할을 수행한다 (Rowland and Mackenzie, 2013; Christen and Fent, 2014; Meech et al., 2019). 이 효소는 다양한 작은 비극성분자(nonpolar small molecules)와 UDP glucuronic acid와의 conjugation반응을 촉매시켜 친수성을 높여 배출을 용이하게 한다. 포유류 UGTs 유전자는 구조 및 아미노산 서열 상동성을 근거로 하여 크게 2가지, UGT1 및 UGT2, 그리고 3개의 하위 subfamily UGT1A, UGT2A 및 UGT2B으로 나뉜다(Kiang et al., 2005; Oda et al., 2015). 포유류 UGTs는 다양한 조직에 발현하는데 특히 간, 장 및 신장조직에서 높은 발현을 나타낸다. 본 연구에서 UGT 유전자는 [60, 80, 100, 120 mg/kg] 투여구간에

서 대조구에 비해 모든 농도구간에서 유의적인 감소를 나타내었다. 특정약물을 노출시켰을 때 대사 효소의 발현과 효소활성은 증가되며, 제I상 효소인 CYP 발현도 함께 유도되는 것으로 알려져 있다. Zebrafish를 환경호르몬인 폴리염화비페닐(polychlorinated biphenyls, Aroclor 1254)에 노출되었을 때 CYP1A와 UGT1A1이 유도되기도 하고 유기용매제인 Dimethyl sulfoxide (DMSO)과 methanol에 24시간 노출시 CYP1A와 UGT1A1의 발현이 감소된다(Jones et al., 2010; David et al., 2012). 유럽강도다리(*Platichthys flesus*)에 Aroclor 1254을 복강주사시 간조직의 UGT1B mRNA발현은 감소하였다(Leaver et al., 2007). UGT 유전자의 기능과 발현이 다양하다고 알려져 있으며(Meech et al., 2019) 뿐만 아니라 UGT유전자의 발현 변화(induction or repression)는 기질 종류(다시 말해서 스테로이드 호르몬, 담즙산 및 생체이물질)와 transcription factor에 의해서 크게 영향받는 것으로 알려져 있다. 본 연구에서는 amprolium 주사한 후에 CYP1A와 UGT1A7발현에서는 다소 다른 경향을 보였다. 이러한 차이는 다양한 UGT유전자의 subfamily members 혹은 약물 종류로 인한 ligand-dependent transcription factors의 작용에 의한 것으로 판단된다. 더 정확한 판단을 위해서는 추가적인 연구가 필요할 것으로 사료된다.

본 연구에서는 [4, 8, 16, 32 mg/kg]로 근육주사 경로로 반복투여하여 48시간 이내 신장조직에서 모든 유전자 발현이 억제되었으나, amprolium의 대사과정이 완료된 시점인 6일차에는 면역지표 및 약물대사 유전자가 대조구와 변화를 나타내지 않았다. 이는 amprolium의 연속적인 반복투여는 넙치에 상당한 영향을 끼칠 수 있으나, 투여시기의 간격을 두고 진행한다면 넙치에게 미치는 약물대사의 독성이 감소할 수 있을 것으로 사료되었다. 뿐만 아니라 보다 약물이 어류에 미치는 영향을 판단하기 위해서는 정보축적 및 발현 분석 등 보다 구체적이고 통합적인 연구가 필요할 것으로 판단된다. 본 연구에 실시된 amprolium의 근육조직에 기생하는 쿠도아충 구제효과를 나타낼 수 있는지에 대한 여부에 대해서는 지속적인 연구가 필요하다.

## 요 약

본 연구에서는 넙치의 해독 과정에서 amprolium hydrochloride의 영향을 평가하기 위해 수행되었다. 이전 연구에서 보고된 amprolium의 LD<sub>50</sub> 값을 이용하여 두 가지 실험을 진행하였다. 첫 번째는 30마리의 넙치를 5개의 대조군 및 실험군으로 나누었고 4, 8, 16, 32 mg/kg 용량의 amprolium을 근육 내 주사 투여하였다. 주사 후 8, 24, 48 시간에 간과 신장을 적출하여 약물 대사 효소와 전염증성 사이토카인 유전자의 발현을 분석하였다. 32 mg/kg 용량의 실험군에서 IL-1 $\beta$  mRNA의 높은 발현을 확인하였고, CYP1A는 이와 반대의 결과를 보였으며, 간에서 UGT와 GST mRNA의 발현은 유의하게 감소하는 것을 확인하였다. 또한 신장에서 amprolium 주사 투여 후 약물 대사 효소와 사이토카인 유전자의 억제가 관찰되었다. 또 다른 실험에서는 4, 8, 16, 32 mg/kg과 60, 80, 100, 120 mg/kg의 용량을 설정하여 근육 내 주사 투여하였다. 주사를 완료하고 6일 후 간을 적출하여 유전자의 발현을 확인하였다. IL-1 $\beta$ 의 발현은 4 mg/kg 용량 실험군에서 유의적으로 매우 높은 발현을 보였다. GST의 mRNA 발현 또한 4 mg/kg 용량 실험군에서 높은 발현을 보였다. 결론적으로 우리의 결과는 amprolium이 가축 산업의 가장 안전한 합성 항콕시딕 약물 중 하나로 간주되지만 넙치의 간접 또는 직접적인 물리적 또는 생물학적 독성을 유발하는 것으로 판단된다.

## 사 사

이 논문은 국립수산과학원(P2023202, 넙치쿠도 아층 저감화 연구)의 지원에 의해 진행되었음.

## References

- Ahn, M., Won, S., Kang, B., Gong, P., Yoo, E., Dharane-dharan, S. and Jang, Y.: *In vitro* effect of two commercial anti-coccidial drugs against myxospores of *Kudoa septempunctata* genotype ST3 (Myxozoa, Multivalvulida). *Parasite.*, 24, 2017. 10.1051/parasite/2017012
- Allocati, N., Masulli, M., Dillio, C. and Federici, L.: Glutathione transferases: substrates, inhibitors and pro-drugs in cancer and neurodegenerative diseases. *Oncogenesis.*, 7(1):8, 2018. <https://doi.org/10.1038/s41389-017-0025-3>
- Ballak, D.B., Stienstra, R., Tack, C.J., Dinarello, C.A. and Diepen, J.A.: IL-1 family members in the pathogenesis and treatment of metabolic disease: focus on adipose tissue inflammation and insulin resistance. *Cytokine.*, 75:280–90, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.cyt.2015.05.005>
- Beckett, G.J. and Hayes, J.D.: Glutathione S-transferases: biomedical applications. *Adv. Clin. Chem.*, 30:281-380. 1993. [https://doi.org/10.1016/S0065-2423\(08\)60198-5](https://doi.org/10.1016/S0065-2423(08)60198-5)
- Bouraoui, Z., Banni, M., Ghedira, J., Clerandeanu, C., Guerbej, H., Narbonne, J.F. and Boussetta, H.: Acute effects of cadmium on liver phase I and phase II enzymes and metallothionein accumulation on sea bream *Sparus aurata*. *Fish Physiol. Biochem.*, 34:201-207, 2008. <https://doi.org/10.1007/s10695-007-9177-y>
- Christen, V. and Fent, K.: Tissue-, sex- and development-specific transcription profiles of eight UDP-glucuronosyltransferase genes in zebrafish (*Danio rerio*) and their regulation by activator of aryl hydrocarbon receptor. *Aquat. Toxicol.*, 150:93-102. 2014. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2014.02.019>
- Cook, N., Hansen, A.R., Siu, L.L. and Razak, A.R.A.: Early phase clinical trials to identify optimal dosing and safety. *Mol. Oncol.*, 9:997-1007, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.molonc.2014.07.025>
- David, R.M., Jones, H.S., Panter, G.H., Winter, M.J., Hutchinson, T.H. and Chipman, J.K.: Interference with xenobiotic metabolic activity by the commonly used vehicle solvents dimethylsulfoxide and methanol in zebrafish (*Danio rerio*) larvae but not *Daphnia magna*. *Chemosphere.*, 88(8):912-917, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2012.03.018>
- Durou, C., Poirier, L., Amiard, J.C., Budzinski, H., Gnassia-Barelli, M., Lemenach, K., Peluhet, L., Mouneyrac, C., Romeo, M. and Amiard-Triquet, C.: Biomonitoring in a clean and a multi-contaminated estuary based on biomarkers and chemical analyses in the endobenthic worm *Nereis diversicolor*. *Environ. Pollut.*, 148:445–458, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2006.12.022>
- Duszynski, D.W., Kvicerova, J. and Seville, R.S.: The biology and identification of the Coccidia (*Apicomplexa*) of carnivores of the world. AP., 2018.
- EMA.: Committee for veterinary medicinal products

- (CVMP) - Amprolium summary report (1), EMEA/MRL/721/99/London, 1999.
- George, S., Wright, J., Martinez-Lara, E., Carpena, E. and Kindt, M.: Levels of cellular glutathione and metallothionein affect the toxicity of oxidative stressors in an established carp cell line. *Mar. Environ. Res.*, 50(1-5):503-508, 2000. [https://doi.org/10.1016/S0141-1136\(00\)00125-2](https://doi.org/10.1016/S0141-1136(00)00125-2)
- Ghezzi, P.B.P.V.M.C., Saccardo, B., Villa, P., Rossi, V., Bianchi, M. and Dinarello, C.A.: Role of interleukin-1 in the depression of liver drug metabolism by endotoxin. *Infection and immunity*, 54(3), 837-840, 1986. <https://doi.org/10.1128/iai.54.3.837-840.1986>
- Gibson, T.P.: Renal disease and drug metabolism: an overview. *American Journal of Kidney Diseases*, 8(1), 7-17, 1986. [https://doi.org/10.1016/S0272-6386\(86\)80148-2](https://doi.org/10.1016/S0272-6386(86)80148-2)
- Ghosh, M.C., Ghosh, R. and Ray, A.K.: Impact of copper on biomonitoring enzyme ethoxyresorufin-o-deethylase in cultured catfish hepatocytes. *Environ. Res.*, 86(2):167-173, 2001. <https://doi.org/10.1006/enrs.2001.4249>
- Grabner, D., Yokoyama, H., Shirakashi, S. and Kinami, R.: Diagnostic PCR assays to detect and differentiate *Kudoa septempunctata*, *K. thyrssites* and *K. lateolabracis* (Myxozoa, Multivalvulida) in muscle tissue of olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Aquaculture*, 338:36-40, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2012.01.022>
- Gudin, J. and Fudin, J.: Peripheral Opioid Receptor Antagonists for Opioid-Induced Constipation: A Primer on Pharmacokinetic Variabilities with a Focus on Drug Interactions. *J Pain Res.*, 13:447-456, 2020. <https://doi.org/10.2147/JPR.S220859>
- Gunaratna, C.: Drug metabolism & pharmacokinetics in drug discovery: a primer for bioanalytical chemists, part I. *Curr Sep.*, 19(1):17-23, 2000.
- Higgins, L.G. and Hayes, J.D.: The cap'n'collar transcription factor Nrf2 mediates both intrinsic resistance to environmental stressors and an adaptive response elicited by chemopreventive agents that determines susceptibility to electrophilic xenobiotics. *Chem. Biol. Interact.*, 192(1-2):37-45, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2010.09.025>
- Hodgson, E. and Levi, P.E.: Introduction to Biochemical Toxicology. 2nd. Norwalk, Conn, USA: Appleton & Lange., 1994.
- Jancova, P., Anzenbacher, P. and Anzenbacherova, E.: Phase II drug metabolizing enzymes. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.*, 154(2):103-116, 2010.
- Jancova, P. and Šiller, M.: Phase II drug metabolism. *Topics on drug metabolism.*, 35-60, 2012.
- Jones, H.: Xenobiotic metabolism and zebrafish (*danio rerio*) larvae (Doctoral dissertation, University of Birmingham). UOB., 2010.
- Kiang, T.K., Ensom, M.H. and Chang, T.K.: UDP-glucuronosyltransferases and clinical drug-drug interactions. *Pharmacol. Ther.*, 106, 97-132. 2005. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2004.10.013>
- Kim, H.N., Park, C.I., Chae, Y.S., Shim, W.J., Kim, M., Addison, R.F. and Jung, J.H.: Acute toxic responses of the rockfish (*Sebastes schlegeli*) to Iranian heavy crude oil: Feeding disrupts the biotransformation and innate immune systems. *Fish Shellfish Immunol.*, 35(2):357-365, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2013.04.041>
- Knaapen, A.M., Shi, T., Borm, P.J. and Schins, R.P.: Soluble metals as well as the insoluble particle fraction are involved in cellular DNA damage induced by particulate matter. *Mol. Cell. Biochem.*, 234: 317-326. 2002. <https://doi.org/10.1007/97>
- Laforge, M., Elbim, C., Frère, C., Hémadi, M., Massaad, C., Nuss, P., Benoliel, J.J. and Becker, C.: Tissue damage from neutrophil-induced oxidative stress in COVID-19. *Nat. Rev. Immunol.*, 20(9):515-516, 2020. <https://doi.org/10.1038/s41577-020-0407-1>
- Leaver, M.J., Wright, J., Hodgson, P., Boukouvala, E. and George, S.G.: Piscine UDP-glucuronosyltransferase 1B. *Aquat. Toxicol.*, 84(3):356-365, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2007.06.015>
- Livak, K.J. and Schmittgen, T.D.: Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method. *methods.*, 25(4):402-408, 2001. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
- Matsukane, Y., Sato, H., Tanaka, S., Kamata, Y. and Sugita-Konishi, Y.: *Kudoa septempunctata* n. sp. (Myxosporea: Multivalvulida) from an aquacultured olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) imported from Korea. *J. Parasitol. Res.*, 107:865-872, 2010. <https://doi.org/10.1007/s00436-010-1941-8>
- Meech, R., Hu, D.G., McKinnon, R.A., Mubarakah, S. N., Haines, A.Z., Nair, P.C., Rowland, A. and Mackenzie, P.I.: The UDP-glycosyltransferase (UGT) superfamily: new members, new functions, and novel paradigms. *Physiol Rev.*, 99:1153-1222, 2019. <https://doi.org/10.1152/physrev.00058.2017>

- Mohana, K. and Achary, A.: Human cytosolic glutathione-S-transferases: quantitative analysis of expression, comparative analysis of structures and inhibition strategies of isozymes involved in drug resistance. *Drug Metab. Rev.*, 49(3):318-337, 2017. <https://doi.org/10.1080/03602532.2017.1343343>
- Monshouwer M., Witkamp R.F., Nijmeijer S.M., Van Amsterdam J.G. and Van Miert A.: Suppression of cytochrome P450- and UDP glucuronosyl transferase-dependent enzyme activities by proinflammatory cytokines and possible role of nitric oxide in primary cultures of pig hepatocytes. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 137:237-244, 1996. <https://doi.org/10.1006/taap.1996.0077>
- Moreira, S.M. and Guilhermino, L.: The use of *Mytilus galloprovincialis* acetylcholinesterase and glutathione S-transferases activities as biomarkers of environmental contamination along the northwest Portuguese coast. *Environ. Monit. Assess.*, 105:309-325, 2005. <https://doi.org/10.1007/s10661-005-3854-z>
- Oda, S., Fukami, T., Yokoi, T. and Nakajima, M.: A comprehensive review of UDP-glucuronosyltransferase and esterases for drug development. *Drug Metab. Pharmacokinet.*, 30:30-51, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.dmpk.2014.12.001>
- Park, S.H., Choi, Y.K., Do, J.W., Choi, H.S. and Kim, Y.K.: Acute toxicity of amprolium hydrochloride in *Paralichthys olivaceus*. *Fish Pathol.*, 36(1):141-150, 2023.
- Pandey, D.G.: Treatment for certain parasitic diseases of fishes. *Universal Journal of Pharmacy*, 2(02), 1-3, 2013.
- Rehberger, K., Bailey, C., Von Siebenthal, E.W. and Segner, H.: Transcriptomic analysis of the impacts of ethinylestradiol (EE2) and its consequences for proliferative kidney disease outcome in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Comp. Biochem. Physiol. Part - C: Toxicol. Pharmacol.*, 222:31-48, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2019.04.009>
- Rowland, A., Miners, J.O. and Mackenzie, P.I.: The UDP-glucuronosyltransferases: their role in drug metabolism and detoxification. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 45(6):121-132, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2013.02.019>
- Seppola, M., Larsen, A.N., Steiro, K., Robertsen, B. and Jensen, I.: Characterisation and expression analysis of the interleukin genes, IL-1 $\beta$ , IL-8 and IL-10, in Atlantic cod (*Gadus morhua* L.). *Mol. Immunol.*, 45(4):887-897, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2007.08.003>
- Shin, H.C.: 화학물질의 독성시험. *Korean J. Vet. Res.*, 33(5):292-297, 1997.
- Shin, S.P., Hong, H.K., Jin, C.N., Sohn, H., Choi, K.S. and Lee, J.: Effect of Epigallocatechin Gallate on Viability of *Kudoa septempunctata*. *Korean J. Parasitol.*, 58(5):593, 2020. [10.3347/kjp.2020.58.5.593](https://doi.org/10.3347/kjp.2020.58.5.593)
- Sitjà-Bobadilla, A.: Can Myxosporean parasites compromise fish and amphibian reproduction. *Proc. R. Soc. B: Biol. Sci.*, 276:2861-2870, 2009. <https://doi.org/10.1098/rspb.2009.0368>
- Taxak, N. and Bharatam, P.V.: Drug metabolism: A fascinating link between chemistry and biology. *Resonance.*, 19:259-282, 2014. <https://doi.org/10.1007/s12045-014-0031-0>
- Xu, X., Cui, Z., Wang, X., Wang, X. and Zhang, S.: Toxicological responses on cytochrome P450 and metabolic transferases in liver of goldfish (*Carassius auratus*) exposed to lead and paraquat. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 151, 161-169, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.12.062>
- Yokoyama, H., Whipps, C.M., Kent, M.L., Mizuno, K. and Kawakami, H.: *Kudoa thyrsites* from Japanese flounder and *Kudoa lateolabracis* n. sp. from Chinese sea bass: causative myxozoans of post-mortem myoliquefaction. *Fish Pathol.*, 39:79-86, 2004. <https://doi.org/10.3147/jfsfp.39.79>
- Yokoyama, H., Yanagida, T. and Shirakashi, S.: *Kudoa ogawain* sp.(Myxozoa: Multivalvulida) from the trunk muscle of Pacific barrelfish *Hyperoglyphe japonica* (Teleostei: Centrolophidae) in Japan. *Parasitol. Res.*, 110:2247-2254, 2012. <https://doi.org/10.1007/s00436-011-2756-y>
- Yokoyama, H.: Kudoosis of marine fish in Japan. *Fish Pathol.*, 51:163-168, 2016.
- Zelikoff, J.T.: Biomarkers of immunotoxicity in fish and other non-mammalian sentinel species: predictive value for mammals?. *Toxicology.*, 129(1):63-71, 1998. [https://doi.org/10.1016/S0300-483X\(98\)00064-X](https://doi.org/10.1016/S0300-483X(98)00064-X)