

흰다리새우(*Litopenaeus vannamei*)에서 광범위 반합성 항생제 doxycycline의 독성연구

이채원* · 배준성* · 양찬영* · 정은하* · 이지훈** · 박관하* †

*전북 군산시 미룡동 산 68 번지 군산대학교 해양과학대학 수산생명의학과

**부산광역시 기장군 기장읍 기장해안로 216, 국립수산물과학원 수산방역과

Toxicity of doxycycline, a broad-spectrum semi-synthetic antibiotic, in Pacific whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*)

Chae Won Lee*, Jun Sung Bae*, Chan Yeong Yang*, Eun Ha Jeoung*,
Ji-Hoon Lee** and Kwan Ha Park*†

*Department of Aquatic Life Medicine, College of Ocean Science & Technology,
Kunsan National University, San-68 Miryong-dong, Gunsan City, Jeonbuk, Korea

**Aquatic Animal Disease Control Center, National Institute of Fisheries Science (NIFS),
216 Gijanghaean-ro Gijang-eup, Gijang-gun, Busan 46083, Republic of Korea

Doxycycline is a semi-synthetic broad-spectrum antibiotic, and it has been used to get rid of bacteria in animals and humans. The use of antibiotics has greatly contributed to the aquaculture production although its misuse sometimes presents public health problems. This study was performed to investigate the toxic effects of doxycycline on whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*) administered for possible infection treatments. The shrimp were allocated into four groups and doxycycline was fed three times a day for 7 days at 0, 20, 50 and 100 mg/kg to each group. After 24 hr following the 7-day treatment, hemolymph and hepatopancreas were used for blood and biochemical analysis: Total hemocyte counts, Total protein, Total cholesterol, Glucose, Glutamic pyruvic transaminase, Glutamic oxaloacetic transaminase, Glutathione peroxidase, Superoxide dismutase, Glutathione-s-transferases, Total antioxidant capacity colorimetric and Acid phosphatase. In addition, histopathological examination was performed on the hepatopancreas and muscle. It was observed that body weight gain was significantly retarded in 100 mg/kg doxycycline group. Doxycycline was found to induce biochemical or functional disorders at 100 mg/kg as observed many of the blood and biochemical parameters were significantly reduced. In conclusion, it was judged that there will be no major toxicity problems with doxycycline when used for shrimp aquaculture at regular doses.

Key words: Doxycycline, *Litopenaeus vannamei*, Toxicity, Biochemical.

†Corresponding author: Kwan Ha Park
Tel: +82-63-469-1885, Fax: +82-63-463-9493
E-mail: khpark@kunsan.ac.kr

서 론

Tetracycline계 항생제에는 oxytetracycline, minocycline, chlortetracycline, tetracycline, methacycline, demeclocycline 및 doxycycline 등을 비롯한 여러 구조적으로 유사한 항생제가 알려져 있다. 이 계열의 항생제는 ribosome 30S 서브 유닛에 가역적으로 결합하여 아미노산과 t-RNA의 화합을 방지해 단백질 합성을 억제하며, 미토콘드리아에서도 70S 리보솜과의 결합을 통해 단백질 합성을 억제한다(Ian and Marilyn, 2001). Tetracycline 계열은 항균작용 스펙트럼이 광범위한 항생제로서 그람 양성, 그람 음성, 비정형 박테리아뿐만 아니라 리켓차, 클라미디아와 같은 세균이나 말라리아와 같은 원생동물류에 대해서도 부분적으로 작용한다(Holmes and Charles, 2009). 흥미롭게도 doxycycline은 혈관형성과 세포 사멸을 예방하고 잇몸에 섬유아세포 부착을 향상하고 상처를 치유하는 등 부가적인 작용도 한다(Chaidemenos, 2001; Ramamurthy *et al.*, 2002; Skidmore *et al.*, 2003). 또한, 염증성 세포에 의해 생성된 단백질 분해 효소인 특정 기질 금속 단백질분해효소를 억제하는 작용도 알려져 있으며 이로 인해 다양한 항염증 및 항종양성 역할에도 기여하고 있다(Pasquale and Tan 2009; Weinberg, 2005).

포획어업의 점진적 감소에 따라 양식업은 전 세계적으로 빠르게 성장하는 산업으로서, 식용 단백질 및 영양소의 공급을 위해 생산의 지속기가 가능해야 할 생물산업이다. 2014년 식량 농업기구(FAO)의 보고서에 따르면 전 세계 양식업 생산량은 지난 10년 동안 두 배로 증가하여 현재는 사람이 소비하는 수산물 생산제품의 50%까지 차지하고 있다(FAO, 2014). 또한, 양식종의 다양화에 기인하여, 양식업의 증가는 어류뿐만 아니라 갑각류, 패류 및 해조류에까지 확장되어 나가고 있다. 새우양식 생산량은 전 세계적으로도 매년 16.8%의 성장률을 기록하고 있다(Subnutith *et al.*, 2008; Janarthanam *et al.*, 2012). 국내 새우 양식산업에서 이전에는 대하가 가장 중요한 생물 종이었으나, 2000년 후반부부터는 흰반점바이러스를 포함하여 여러 가지 질병에 의한 피해를 회피하기 위해 바이러스

성 질병에 대한 저항성이 높은 흰다리새우(*Litopenaeus vannamei*)로 전환하게 되었다. 현재 이 생물 종은 갑각류 양식의 가장 중요한 부분을 차지하고 있다(Jang *et al.*, 2007). 그러나 인공양식에서는 밀식 형태의 양식 방법을 피하기 어려워 세균 또는 바이러스 감염에 의한 질병 발생과 부적절한 사육 환경 등으로 인해 새우양식이 적지 않은 도전을 받고 있다(Pattamarat *et al.*, 2010). 현재, 우리나라에서 흰다리새우 양식의 주요 폐사 원인 중 감염성 요인이 12.5 %, 비감염성 58.7 %로 전체적으로 71.2 %의 피해율을 보여주고 있다(Jin Woo kim *et al.*, 2012). 흰다리새우양식장에서는 세균 감염증 중 비브리오 감염증이 상당히 심각한 문제를 유발하고 있다(Janarthanam *et al.*, 2012).

이렇듯 새우 양식업은 빠르게 증가하고 있지만, 부적절한 사육 환경, 세균 또는 바이러스 감염에 의한 질병 발생, 그로 인한 사망률로 인해 생산량이 영향을 받고 있다. 새우 양식장에서는 질병을 예방하고 치료하기 위해 사육 환경 관리, 새우에 대한 스트레스 감소, 항생제 또는 소독제가 양식에 다양하게 적용되고 있으나 아직 해결해야 할 많은 문제가 남아 있다(Kulwadee *et al.*, 2011). 거의 모든 수산양식에서는 tetracycline계 항생제의 사용이 증가하면서 새우양식에서도 양식업에서 유효한 항생제로 도입되고 있다. 반합성 공정에 의해 생산되는 doxycycline은 특히 병원성 세균에서 내성 발생율이 낮고 어류를 포함한 동물용으로 허가되고 있기 때문에(Holmes and Charles, 2009; Frenzel T *et al.*, 2008; 국립수산물과학원, 2016) 새우양식에서도 적용할 수 있는지를 평가하는 것은 큰 의미가 있을 것이다. 그러나 흰다리새우에서 이 항생제가 미치는 독성에 대한 기초 자료는 아직 전혀 보고된 바가 없다. 더구나 doxycycline뿐 아니라 다른 수산용 의약품의 경우에도 흰다리새우에서 독성을 평가한 사례가 극히 드물다.

본 연구는 doxycycline을 흰다리새우에 활용할 수 있는지를 평가하고자 할 때 필요한 자료 중 독성학적 영향을 검토하기 위하여 수행하였다. 이를 위해 doxycycline을 여러 수준의 용량으로 투여하고, 혈액학적, 생화학적 및 병리조직학적 영향을 확인하는 시험을 수행하였다. 아울러서 이와 같은

연구는 아직 갑각류에서 의약품의 독성을 평가하는 방법이 잘 알려지지 않은 현재 상황에서 모델 연구로서의 의미도 지닌다.

재료 및 방법

시험동물 흰다리새우의 입수 및 관리

흰다리새우(*Litopenaeus vannamei*)는 체중 0.2 g 정도의 치하를 부산 소재의 양식장에서 입수하여 1톤의 순환여과수조에서 사육하여 투여 시작 시 체중이 13 g 정도에 도달한 것을 사용하였다. 사육수의 염도는 26 p.s.u., pH는 7.0-8.0, 수온은 28 ± 3 °C를 유지하였으며, 지속적 폭기를 하여 용존산소(dissolved oxygen, DO)는 6.0 ppm 이상을 유지하였다.

Doxycycline의 투여 및 사육 수조 관리

Doxycycline을 투여하기 위한 사료 조제를 위해 총 사료량 15 %에 해당하는 doxycycline을 필요한 농도별로 증류수에 녹여 사료에 균질하게 흡착시킨 후 실험실에서 선풍기를 이용하여 건조하였다. 현재 시판 중인 의약품인 doxycycline은 어류에서 어체중 kg당 20-50 mg을 사료에 골고루 혼합하여 3-7일간 투여한다. 이를 바탕으로 본 실험에서는 doxycycline을 20, 50, 100 mg/kg의 농도로 사료를 조제하였다. 그 이후 사료 500 g을 기준으로 Fish oil 15 mL로 코팅하여 투여 시까지 -20°C의 냉동보관 하였다. 이후 1톤의 순환여과수조에서 순치 시와 같은 조건으로 총 7일 동안 무게의 2%를 매일 3회(오전 7시, 오후 12시, 오후 6시)로 균등하게 나눠서 급이하였다.

성장률 실험

Doxycycline을 흡착시킨 사료를 이용하여 흰다리새우 무게의 2 %의 사료를 매일 3회 총 7일 동안 농도별로 균등하게 급이하였다. 급이 후 3, 7, 14, 28, 42일이 되었을 때 1톤의 순환여과수조에서 150-200 마리 중 15마리만 임의로 포획하여 체중을 측정하였다.

Hemolymph를 이용한 혈액 · 생화학적 지표 측정
혈액학적 분석을 위한 hemolymph 시료 채취는

7일간의 연속 투여 후 마지막 투여 24시간 뒤 시험군당 17-21마리씩 얼음으로 마취한 상태에서 채취하였다. 채취를 위해 항응고제 Alsever's solution (Sigma, St. Louis, USA)을 일회용 주사기에 미리 넣어 hemolymph를 채취하였다. 4,000 rpm에 상온에서 20분간 원심 후 혈장을 채취하여 실험하였다. 분석 후 항응고제와 hemolymph의 희석배수를 고려하여 농도를 계산하였다.

Total hemocyte count을 위해 Alsever's solution 0.4 mL를 미리 넣은 주사기를 사용하여 채취한 혈림프는 즉시 Phosphate-Buffered Saline(PBS)으로 희석하여 Thomas 혈구계수판을 이용하여 계수하였다. TP 측정을 위해 상업용 Kit(Asan set Total protein, 아산제약주식회사, 경기도)를 사용하였다. 즉, 새우 혈림프를 0.05 mL과 정색시액 5 mL을 혼합하고 37°C에서 30분간 방치한 후 96 well plate에 200 µL씩 분주하였다. 30분 이내에 시약 블랭크를 대조로 파장 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. Total cholesterol(T-CHO)의 측정도 상업용 Kit (Asan set Total cholesterol, 아산제약주식회사, 경기도)를 사용하였다. 새우 혈림프를 0.02 mL를 효소시액 3 mL에 혼합하고 37°C에서 5분간 방치한 후 96 well plate에 200 µL씩 분주하였다. 60분 이내에 시약 블랭크를 대조로 파장 500 nm에서 흡광도를 측정하였다. Glucose 측정은 상업용 Kit(Asan set Glucose, 아산제약주식회사, 경기도)를 사용하였다. 새우 혈림프 0.02 mL과 효소시액 3 mL을 혼합하고 37°C에서 5분간 방치한 후 96 well plate에 200 µL씩 분주하였으며 40분 이내에 시약 블랭크를 대조로 파장 500 nm에서 흡광도를 측정하였다. GPT 및 GOT 측정 역시 상업용 Kit(Asan set GPT, 아산제약주식회사, 경기도)를 사용하였다. 이를 위해 새우 혈림프 0.2 mL을 기질액 1 mL과 정색시액 1 mL을 첨가하여 혼합하였다. 수산화나트륨용액을 10배 희석한 액을 10 mL 넣은 후 혼합해 실온에 10분간 방치하였다. 96 well plate에 200 µL씩 분주하였다. 505 nm에서의 흡광도를 측정하였다. GOT, GPT의 측정 법은 Reitman-Frankel법, T-CHO의 측정은 효소법을 이용하여 측정하였으며, TP, Glucose의 측정은 아산제약주식회사의 protocol에 따라 측정하였다.

간체장에서의 생화학적 지표 측정

생화학적 분석을 위한 간체장 시료 채취는 7일 간의 doxycycline 마지막 투여 24시간 뒤 hemolymph 채취가 완료된 새우로부터 조직을 분리하여 사용하였다.

Glutathione peroxidase(GPx) 활성 측정은 상업용 Kit (Glutathione Peroxidase Activity Colorimetric Assay Kit, Biovision, USA)를 사용하였다. 즉, 96 well plate에 희석된 간체장 추출액 35 μ L, Assay buffer 15 μ L를 분주한 후 Reaction Mix 40 μ L를 분주하여 상온에서 15분간 배양하였다. 이후 10 μ L Cumene hydroperoxide solution을 분주하여 340 nm에서 측정하였다. 1분간 1 μ M의 NADPH를 NADP⁺로 환원시키는 효소의 양을 1 unit으로 측정하였다. Superoxide dismutase(SOD) 활성 측정을 위해 상업용 Kit(Superoxide Dismutase Activity Assay Kit, Biovision, USA)를 사용하였다. 96 well plate에 희석된 간체장 추출액 20 μ L, 200 μ L WST working solution, 20 μ L Dilution buffer, 20 μ L Enzyme working solution을 순서대로 분주하여 37°C에 20분간 배양한 후 450 nm에서 측정하였다. Glutathione-S-transferases (GST) 활성 측정을 위해 간체장 0.1 g에 0.25 M Sucrose buffer (10 mM tris, 1 mM EDTA, pH 7.4) 1 mL를 첨가 한 뒤 얼음 위에서 pellet pestle을 이용하여 마쇄하였다. 이후 13,000 G, 4°C에서 20분간 원심분리한 뒤 중층액 400 μ L를 채취 후 희석하여 분석에 사용하였다. 분석은 (김, 2010)의 방법을 다소 변형하여 수행하였다. 즉, 96 well plate에 10 mM 환원형 글루타치온 50, 10 mM CDNB, 희석된 간체장 추출액 50 μ L를 분주하여 340 nm에서 2분 간격으로 측정하였다. GST의 활성도는 340 nm에서 CDNB의 molar extinction coefficient를 9.6 mM⁻¹cm⁻¹로 계산하여 간체장 mg당 1분 동안 conjugate 되는 CDNB의 nmol 수로 표시하였다. T-AOC 측정을 위해 상업용 Kit(Total Antioxidant Capacity Colorimetric Assay Kit, Biovision, USA)를 사용하였으며, 96 well plate에 Cu²⁺ reagent 100 μ L, 희석된 간체장 추출액 100 μ L를 분주하여 상온에서 90분간 배양하였다. 이후 450 nm에서 측정하였다. Acid phosphatase(ACP) 측정은 간체장 0.1 g에 PBS 0.9 mL를 첨가한 뒤 얼음 위에서 pellet pestle

을 이용하여 마쇄하였다. 이후 13,000 G, 4°C에서 20분간 원심분리한 뒤 중층액 400 μ L를 채취 후 희석하여 분석에 사용하였다. 분석은 상업용 Kit (Acid Phosphatase Activity Colorimetric Assay Kit, Biovision, USA)를 사용하였다. 분석에 사용된 간체장은 96 well plate에 희석된 간체장 추출액 80 μ L와 AP buffer 50 μ L를 분주하여 1시간 동안 상온에서 암실배양을 하고, stop solution 20 μ L를 분주하여 혼합 후 405 nm에서 측정하였다. 1분간 1 μ M의 pNPP를 pNP로 가수분해하는 효소의 양을 1 unit으로 측정하였다. GPx, SOD, GST, T-AOC, ACP의 측정은 Total Antioxidant Capacity Colorimetric Assay Kit의 protocol을 참고하였다.

간체장 및 근육에서 병리조직학적 영향 평가

조직병리학적 분석을 위하여 7일간 투여 후 24시간 뒤 10마리씩 조직을 고정하였다. 즉, Davidson액을 사용하여 등 근육 첫 번째, 마지막 마디에 1 cc씩 주입한 뒤 6 L의 고정액에 10마리씩 고정하고, 1주일 후 간체장과 일부 근육(0.5 cm)을 절단하여 카세트에 삽입하였다. 그 후 조직 처리기를 거쳐 파라핀 포매 과정과 박절 과정을 통해 조직을 5 μ m의 두께로 표본을 제작하였다. 조직을 50% ethanol에서 1분간 처리한 후 항온수조에서 알부민을 처리한 slide glass에 넣고 3-4시간 동안 건조하여 hematoxylin-eosin 염색 후 광학현미경으로 검정하였다.

통계학

결과를 평균±표준편차(SD)로 표현하였으며 대조군과 차이는 one-way analysis of variance 분석 후 Newman-Keuls test로 개별군의 차이를 분석하였다. P<0.05일 때 통계학적 유의성이 있다고 판정하였다.

결 과

흰다리새우의 성장

흰다리새우에 doxycycline을 1주일간 경구 투여하고 체중 변화를 본 결과를 Fig. 1에서 보여주고 있다. 대조군의 체중은 전체 시험 기간인 6주 동안

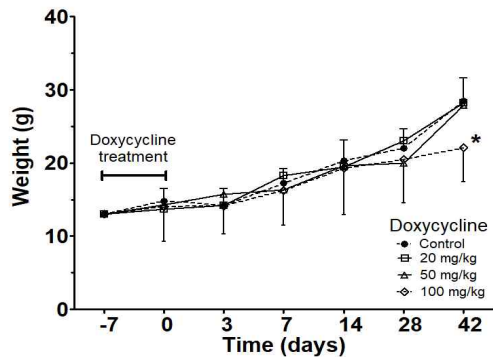


Fig. 1. The growth of whiteleg shrimp after doxycycline administration. Mean values from 15 shrimp for each group and time point. Standard deviations for 20 and 50 mg/kg were omitted for clarity. *Significant difference from control ($p < 0.05$ with Newman-Keuls test).

2배의 증가가 나타났다. Doxycycline을 20 및 50 mg/kg/day로 1주일간 투여하였을 때 체중의 증가에는 아무런 영향이 나타나지 않았다. 그러나 100

mg/kg/day로 투여한 새우에서는 6주에서 체중이 대조군에 비하여 유의성 있게 낮았다.

Hemolymph의 혈액·생화학적 지표

Doxycycline을 100 mg/kg으로 투여하였을 때 시험한 모든 지표에서 유의성 있는 감소가 관찰되었다(Fig. 2). 한편 50 mg/kg에서 GPT에서는 감소 경향이 나타났으나 대조군에 비하여 통계학적 유의성은 없었다. 다른 지표에서는 doxycycline 20 및 50 mg/kg 투여로 인한 혈액·생화학적 지표에서 변화는 발견되지 않았다.

간체장의 생화학적 지표

Doxycycline 투여 후의 간체장 생화학적 지표를 Fig. 3에서 보여주고 있다. Doxycycline을 100 mg/kg으로 투여하였을 때 시험한 5종의 지표 중 GPx, SOD, GST의 활성에서 감소 현상이 발견되었다. 또한, 50 mg/kg 투여로 인해 GST의 감소와 GPx의

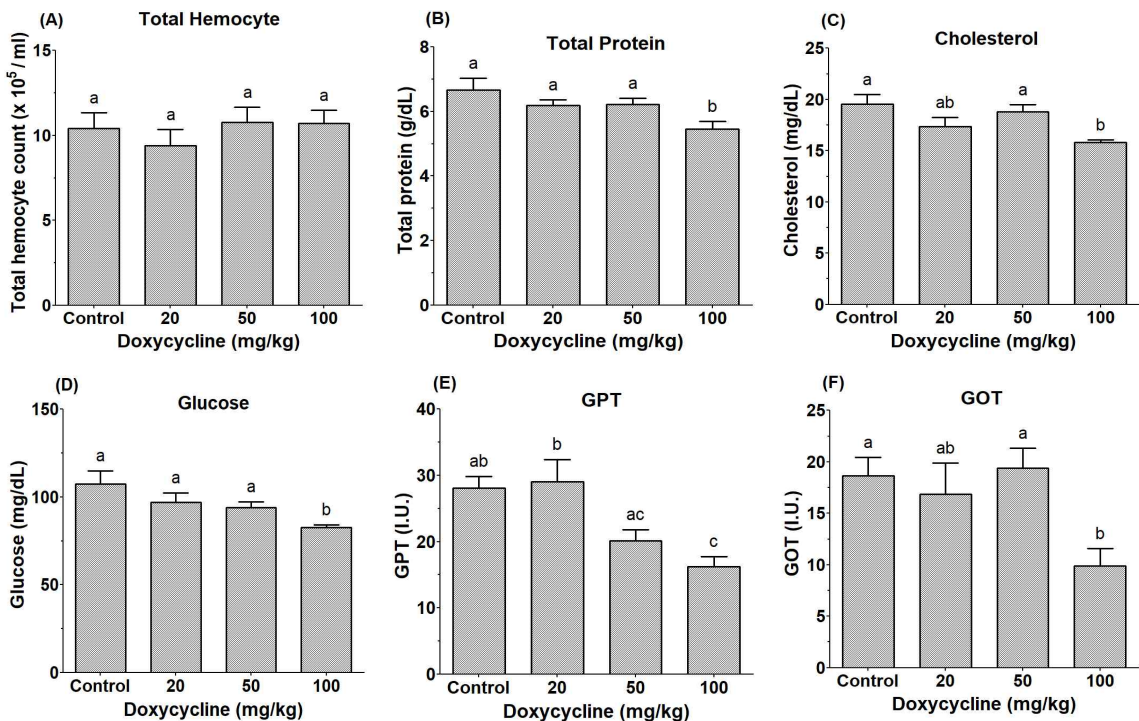


Fig. 2. Hematological parameters of the whiteleg shrimp hemolymph. Total hemocyte (A); total protein (B); cholesterol (C); glucose (D); GPT (E); GOT (F). Data represent mean $\pm$ S.D. ($n = 21$ for each group). Different letters above the columns mean that there are statistical significances compared to the control with Newman-Keul test ($P < 0.05$).

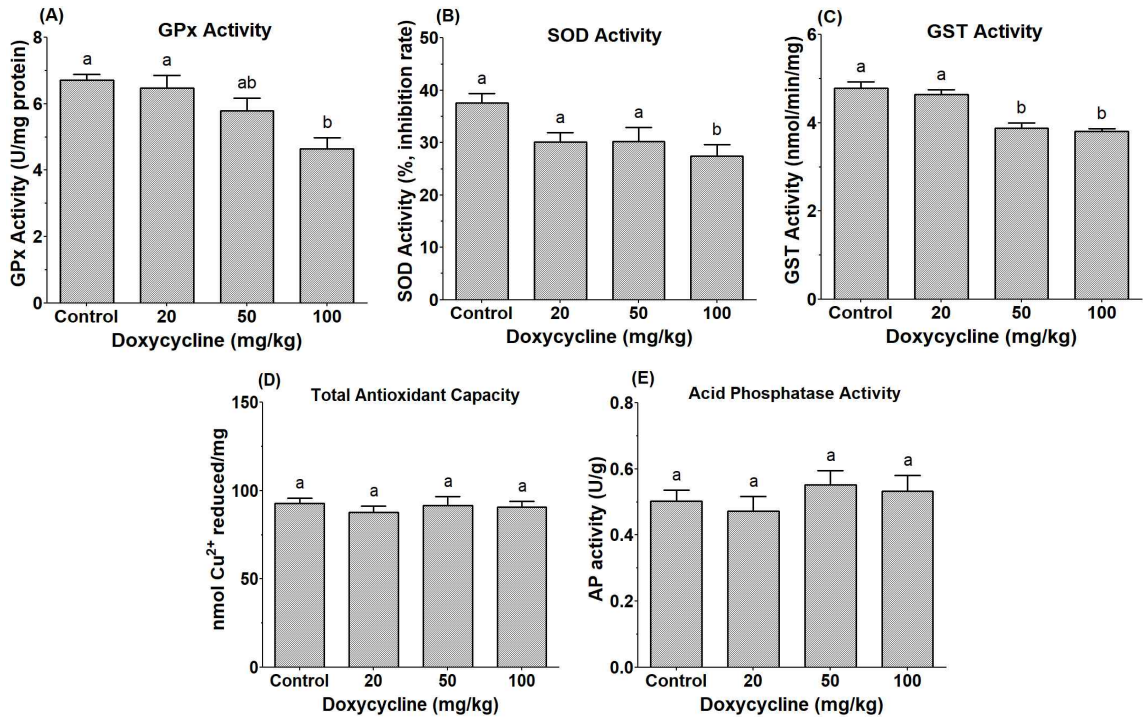


Fig. 3. Biochemical parameters of the whiteleg shrimp hepatopancreas. GPx activity (A); SOD activity (B); GST activity (C); total antioxidant capacity (D); acid phosphatase activity (E). Different letters above the columns mean that there are statistical significances compared to the control with Newman-Keul test ($P < 0.05$).

감소 현상이 관찰되었다. Doxycycline 20 mg/kg에 서는 모든 지표에서 대조군과 차이가 없었다.

향을 평가한 결과 모든 농도에서 병리학적 증상이 나타나지 않았다.

병리조직학적 변화

Fig. 4 및 5에서는 간췌장과 근육의 조직절편을 염색하여 얻어진 검경 결과를 보여주고 있다. Doxycycline 20-100 mg/kg을 1주일간 투여하여 흰 다리새우의 간췌장과 근육에서 병리조직학적 영

고 찰

이 연구에서는 흰다리새우에 doxycycline 20-100 mg/kg을 1주일간 반복 경구 투여한 후에 나타나는 독성에 대하여 평가하였다. 결과를 종합적으로 평

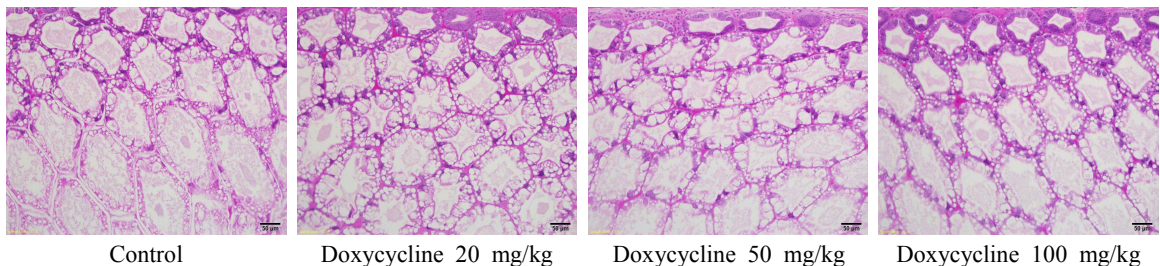


Fig. 4. Microphotographs of the whiteleg shrimp hepatopancreas administered with doxycycline. Tissues were isolated 24 hr after 1 week doxycycline treatment, and hematoxylin-eosin stained sections were prepared.

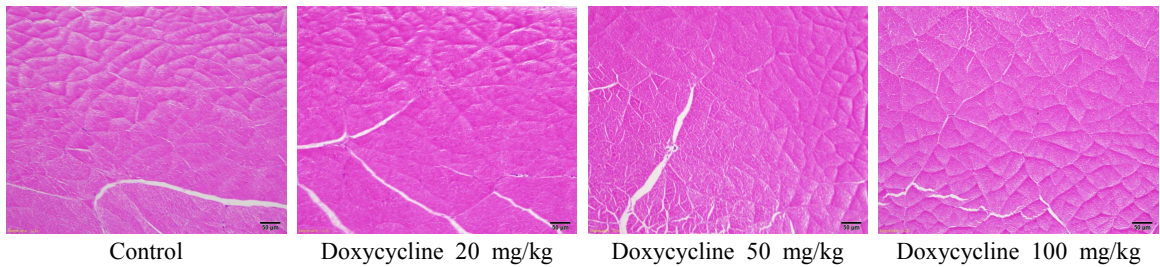


Fig. 5. Microphotographs of the whiteleg shrimp muscle administered with doxycycline. Tissues were isolated 24 hr after 1 week doxycycline treatment, and hematoxylin-eosin stained sections were prepared.

가하면 최고 용량인 100 mg/kg에서 체중의 변화를 포함해 다양한 지표에서 영향이 있는 것으로 판단된다. Doxycycline의 독성을 수생 동물에서 평가한 것은 몇 가지의 문헌(Yeruham *et al.*, 2002; Russell *et al.*, 1996; Hui-chin Lai *et al.*, 2010)에서 보고되어 있지만, 흰다리새우에서의 영향을 평가한 것은 거의 발견되지 않아 지금까지 이 분야는 연구가 거의 이루어지지 않은 것으로 추정된다.

Doxycycline에 의한 직접적인 단백질 합성 저해 작용이 진핵세포에서 규명된 결과가 매우 드물기는 하나, 인간의 혈관내피에서 matrix metalloproteinase라는 효소의 생합성을 저해하는 것이 알려져 있다(Hanemaaijer *et al.*, 1998). 또한, 이 항생제는 항균작용과 무관하게, 진핵세포에서 직접적으로 효소의 활성을 저해하는 작용이 있을 뿐 아니라(Boyle *et al.*, 1998) cytokine의 생리적 역할에 대한 저해작용도 보고되어 있다(Solomon *et al.*, 2000). 따라서 100 mg/kg의 doxycycline 투여 후 발견된 다양한 변수의 변화 기전을 현재의 연구 결과만으로는 확실하게 알 수는 없지만, 고용량의 doxycycline은 단백질 합성 저해 이외에도 추가적인 생화학적 역할을 수행할 수 있을 것으로 추정된다.

본 연구에서는 흰다리새우 hemolymph에서는 총-단백 농도, cholesterol 농도, GPT 및 GOT의 농도가 100 mg/kg의 투여 후 유의성 있게 감소함을 발견하였다. 이러한 hemolymph 혈장 내의 총단백질의 농도 감소는 doxycycline의 항균작용 기전인 단백질 합성 저해(Chopra and Roberts, 2001) 현상을 간접적으로 반영하는 것으로 추정된다.

한편 GOT 및 GPT의 혈장 중 농도 변화는 다른 갑각류에서의 독성 발현의 결과 증가하는 것(José

Guillermo *et al.*, 2000; Zhao *et al.*, 1995; Li *et al.*, 1998)으로 알려져 있다. 그러나 이 연구에서 발견된 현상은 증가가 아니라 감소였으므로, 아마도 doxycycline이 가진 단백질 합성 저해 현상의 직접적인 영향이 있는 것으로 판단된다. 두 효소 모두 주성분이 단백질로 구성된 물질이므로 간체장 등에서 단백질의 합성이 저해된다면, 총합성량의 감소로 인해 활성 또한 당연히 감소하기 때문이다.

간체장에서 평가한 지표 중 중요한 변화는 glutathione peoxidase(GPx), superoxide dismutase(SOD) 및 glutathione-s-transferases(GST)로써 이들 지표는 항산화 수준의 평가에 보통 사용되는 지표들이다(Chien *et al.*, 2003). 이들 3종의 효소계는 활성이 감소하였다. 그러나 이 효소계 감소도 역시 doxycycline의 항산화능의 감소를 초래하였다고 추정되기보다는 단백질 합성 저해의 2차적 영향이었을 것으로 판단된다. 이 효소계들 중에서도 특히 GST는 더 예민하게 합성 저해를 받는 듯하다. 항산화 활성의 직접적 저해가 아니라 단백질 합성 저해 작용으로 추정되는 간접적 증거로는 100 mg/kg doxycycline의 total antioxidant capacity에서는 변화가 없음으로부터 항산화능 자체의 감소가 아님을 찾을 수 있을 것이다.

간체장 및 근육에 대한 병리조직학적 평가를 실시한 결과 doxycycline의 최고 용량에서도 변화가 나타나지 않았다. 이 결과는 doxycycline에 의한 단백질 합성 저해되는 조건에서 조직학적인 측면에서는 심각한 독성이 발생하지 않음을 의미한다.

결론적으로, 이 연구에서 doxycycline에 의한 흰다리새우에의 다양한 용량에서의 독성 발현 여부를 평가로 한 결과 100 mg/kg에서는 생화학적인

또는 기능적인 장애 현상이 나타남을 발견하였다. 한편, 이 용량에서도 세포 구조적으로는 심각한 영향이 없을 것으로 추정된다. Doxycycline은 실제 투여용량에서 50 mg/kg 정도가 최대 수준이므로 실제 양식장에서 사용 시는 큰 문제가 없을 것으로 판단된다.

본 연구는 흰다리새우에서의 항생제 독성을 혈액학, 생화학적 및 조직학적 시험을 처음으로 평가한 의미를 갖는다. 현재 흰다리새우에서의 수산용 의약품의 독성을 평가하는 표준화된 방법은 없다. 따라서 유사한 연구가 수행된 사례가 거의 전혀 없는 현재 상황에서, 이 연구 결과로부터는 흰다리새우에서는 어떤 지표를 평가하는 것이 가능한지 또한 변화를 관찰할 수 있는지를 검토하였다는 중요한 의미를 찾을 수 있을 것이다.

감사의 글

이 논문은 2020년 군산대학교 수산과학연구소 학술연구비 지원에 의하여 연구되었음.

References

- 국립수산과학원 전락양식부 수산방역과 : 2016 수산용 의약품 제품 요약 해설집. pp. 25-26, pp. 61-86, 한국, 2016.
- 김경민 : 옥수수유, 들깨유, 정어리유의 급여가 발암 물질의 투여한 쥐 간의 Glutathione S-transferase(GST-P) 양성결과와 Glutathione 관련 효소계에 미치는 영향. 한국식품영양학회, 23(2):276-284, 2010.
- Boyle, J. R., McDermott, E., Crowther, M., Wills, A. D., Bell, P. R. F., and Thompson, M. M. : Doxycycline inhibits elastin degradation and reduces metalloproteinase activity in a model of aneurysmal disease. J. Vasc. Surg, 27:354-361, 1998.
- Chien, Y.H., Pan, C.H. and Hunter, B. : The resistance to physical stresses by *Penaeus monodon* juveniles fed diets supplemented with astaxanthin. Aquaculture, 216:177-191, 2003.
- Chopra, I. and Roberts, M. : Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. Microbiology Mol Biol Rev, 65(2):232-260, 2001.
- FAO, The 2014 state of world fisheries and aquaculture. : In Food and Agriculture Organization of the United Nations. Rome, Italy. 2014.
- Frenzel, T., Lee, C.H., Kim, H., Quinnine, N.J., Hashimoto, T., Lawton, M.T., Guglielmo, B.J., McCulloch, C.E. and Young, W.L. : Feasibility of minocycline and doxycycline use as potential vasculostatic therapy for brain vascular malformations: pilot study of adverse events and tolerance. Cerebrovasc Dis, 25:157-163, 2008.
- George, C.C. : Tetracycline and niacinamide in the treatment of blistering skin diseases. Clin Dermatol, 19:781-785, 2001.
- Hanemaaijer, R., Visser, H. J., Koolwijk, P., Sorsa, T., Salo, T., Golub, L. M., and Hinsbergh, V. W. : Inhibition of MMP synthesis by doxycycline and chemically modified tetracyclines (CMTs) in human endothelial cells. Adv. Dent. Res, 12:114-118, 1998.
- Holmes, N.E. and Charles, P.G.P. : Safety and efficacy review of doxycycline. Clinical Medicine: Therapeutics, 1:471-482, 2009.
- Jeffrey, M.W. : The anti-inflammatory effects of tetracyclines. Cutis, 75:6-11, 2005.
- José Guillermo, G.R., Luisella, D.V., G, L.A. and H, R.M. : Enzymatic and osmoregulative alterations in white shrimp *Litopenaeus vannamei* exposed to pesticides. Chemosphere, 40:233-237, 2000.
- Kanjana, K., Rattanapit, T., Asuvapongpatana, S., Withayachumnamkul, B. and Wongprasert, K. : Solvent extracts of the red seaweed *Gracilaria fisheri* prevent *Vibrio harveyi* infections in the black tiger shrimp *Penaeus monodon*. Fish shellfish Immunol, 30:389-396, 2011.
- Kim, J.W., Lee, H.N., Jee, B.Y., Woo, S.H., Kim, Y.J. and Lee, M.K. : Monitoring of the mortalities in the aquaculture farms of South Korea. J.Fish Pathol, 25(3):271-277, 2012.
- Lai, H.C., Yeh, Y.C., Ting, C.T., Lee, W.L., Lee, H.W., Wang, L.C., Wang, K.Y., Lai, H.C., Wu, A., and Liu, T.J. : Doxycycline suppresses doxorubicin-induced oxidative stress and cellular apoptosis in mouse hearts. European J. Pharmacology, 644:176-187, 2010.
- Li, S., Wang, G., Weng, W., Tang, H. and Lin, Q. : Effects of heavy metals on survival and metabolic enzyme activities of postlarvae *Penaeus japonicus*, pp. 115-120, J. of Applied Oceanography in Taiwan Strait, Taiwan, 1998.
- Nimrat, S., Bart, A.N., Keataskit, A. and Vuthiphandchai, V. : Microbial flora of spermatophores from black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) declines over

- long-term cryostorage. *Aquaculture*, 274:247-253, 2008.
- Nungavarum, S.R., Barry, R.R., Robert, G.A., Xu, J.W., Liu, Y., Turner, G., Golub, L.M. and Vernillo, A.T. : Inhibition of matrix metalloproteinase-mediated periodontal bone loss in rats: a comparison of 6 chemically modified tetracyclines. *J Periodontol*, 73: 726-734, 2002.
- Rattanachuay, P., Kantachote, D., Tantirungkij, M., Nitoda, T. and Kanzaki, H. : Inhibition of shrimp pathogenic vibrios by extracellular compounds from a proteolytic bacterium *Pseudomonas* sp. W3. *Electronic J Biotechnol*, 13:1-12, 2010.
- Roebert, S., Rodney, K., Clay, W., John, T., Mark, B., James, L., Christopher, P. and Robert, A. : Effects of subantimicrobial-dose doxycycline in the treatment of moderate acne. *Arch Dermatol*, 139:459-464, 2003.
- Russell, P., Eley, S.M., Bell, D.L., Manchee, R.J. and Titball, R.J. : Doxycycline or ciprofloxacin prophylaxis and therapy against experimental *Yersinia pestis* infection in mice. *J.Antimicrobial Chemotherapy*, 37:769-774, 1996.
- Solomon, A., Rosenblatt, M., Li, D, Q., Liu, Z., Monroy, D., Ji, Z., Lokeshwar, B, L., and Pflugfelder, S, C. : Doxycycline inhibition of interleukin-1 in the corneal epithelium. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci*, 41: 2544-2557, 2000.
- Timothy, R.P. and James, S.T. : Nonantimicrobial effects of antibacterial agents. *Clinical Infect Dis*, 40: 127-135, 2005.
- Yeruham, I., Perl, S., Sharony, D. and Vishnisky, Y. : Doxycycline toxicity in calves in two feedlots. *J.Vet. Med B*, 49:406-408, 2002.
- Zhao, W., Wei, H., Jia, J., and Lu, D. : Effects of cadmium on transaminase activities and structures of tissues in freshwater giant prawn(*Macrobrachium rosenbergii*), pp. 21-27, Shanghai Fisheries University, China, 1995.

Manuscript Received : May 25, 2020

Revised : Jun 15, 2020

Accepted : Jun 17, 2020

