

Taurine-FTM의 근육 주사가 넙치의 간 독성 완화와 선천성 면역에 미치는 효과

최재혁 · 정상목 · 강인성 · 최상훈[†]

군산대학교 해양과학대학 수산생명의학과

Effects of intramuscular injection of Taurine-FTM on anti-hepatotoxicity and innate immunity in olive flounder, *paralichthys olivaceus*

Jae Hyeok Choi, Sang Mok Jung, In Sung Kang and Sanghoon Choi[†]

Department of Aquatic Life Medicine, College of Ocean Science and Technology,
Kunsan National University, 558 Daehak-ro, Gunsan-si, Jeonbuk, Korea

In the study, we investigated the effect of Taurine-FTM, which is a commercially available fishery nutritional supplements complex, on anti-hepatotoxicity stressed with thioacetamide (TAA) and innate immune responses in olive flounder. To investigate the change in liver toxicity, firstly, TAA (30 ppm/100 g of fish) was intraperitoneally (i.p.) administered 12 hr after the intramuscular (i.m.) injection of Taurine-FTM (0.02 ml/100 g of fish)(Taurine/TAA). Secondly, Taurine-FTM was i.m. injected 24 hr after the administration of TAA (TAA/Taurine). Finally, TAA was administered simultaneously with Taurine-FTM (TAA+Taurine). All blood samples were collected 24 hr after injection. GOT level in group Taurine/TAA appeared similar to the control, whereas group TAA/Taurine and TAA+Taurine showed significantly increased ($p<0.05$) levels compared to the control. In GPT level, group Taurine/TAA and TAA/Taurine showed elevated levels compared to the control, whereas no significant difference was observed between group TAA+Taurine and the control. Serum ACH₅₀ activity was significantly ($p<0.05$) augmented 24 hr after Taurine-FTM injection compared to the control group, whereas no significant increase was observed 48 hr after Taurine-FTM injection. On the other hand, serum lysozyme activity elevated in an acute stressed condition appeared significantly down-regulated 24 and 48 hr after Taurine-FTM injection compared to the control. In conclusion, i.m. injected Taurine-FTM augmented flounder serum complement activity and decreased a possible handling stress resulting in reducing a serum lysozyme activity and recovering hepatotoxicity. Thus, it is assumed that i.m. injection of Taurine-FTM mixed with antibiotics or available vaccines could be utilized as an anti-hepatotoxic recipe in fish culture industry.

Key words: Taurine-FTM, hepatotoxicity, olive flounder, glutamic oxaloacetic transaminase, glutamic pyruvic transaminase, innate immunity, ACH₅₀

[†]Corresponding author: Sanghoon Choi
Tel: +82-63-469-1886, Fax: +82-63-463-9493
E-mail: shchoi@kunsan.ac.kr

각 종 병원성 미생물에 의한 축산 동물에 질병 발생 시 고농도의 항생제 만을 투여할 경우 축산 동물이 생리적으로 받는 약물 스트레스는 엄청나다. 그로 인해 간 기능의 저하는 물론 전체적인 면역기능이 약화됨으로써 복합적 감염성 질병에 노출되기 쉽다. 그러나 축산 동물을 대상으로 비타민제를 항생제와 병용했을 경우 간 기능의 회복과 더불어 면역력이 증대되는 것으로 알려져 있다 (Kim 등, 2012).

수산생물의 일종인 어류는 호흡은 물론 조혈기전에서 육상동물과는 현저히 차이가 있다. 또한 외부의 소음 및 핸들링 스트레스에 민감하고 수중의 각종 감염성 질병 미생물에 상시 노출되어 있어 질병이 발생 되었을 시 순식간에 대량 폐사가 일어나 양식 어가에 막대한 경제적 손실을 주고 있다. 양식 어류의 경우 세균성 질병이 발생 되었을 시 허가받은 어류용 항생제를 사용하지만 항생제나 백신투여 시 육상동물보다 handling 스트레스에 더욱 민감하여 어체의 간 기능은 물론 전체적인 면역기능이 저하되는 것이 사실이다 (Seo 등, 2020). 이러한 문제점을 해결하기 위해 현재 상용화되고 있는 축산용 제품인 Hepavita {(주)이글벳, 한국}와 유효성분이 비슷한 신제품 “수산용 Taurine-FTM”(이하 Taurine-FTM)를 대상으로 인위적으로 약물을 중독시킨 넙치의 약화 된 간 기능 회복에 어떠한 영향을 미치는지에 대해 알아보려고 하였다.

실험에 사용된 넙치 (*Paralichthys olivaceus*)는 평균체중 70 ± 2.3 g으로 전남 완도소재의 양식장에서 분양받아 100 ppm 농도의 포르말린(37% formaldehyde)으로 30분 동안 약욕 시킨 후 PVC 원형수조에 일주일 간 순치 시켰다. 실험에 사용된 사각 유리수조 (900×450×450 mm)에 해수를 수심 400 mm만큼 채운 후 수온은 $20 \pm 3^\circ\text{C}$ 로 유지하였으며 순환 여과식 사육법을 사용하였다. 환수는 일주일에 1회씩 100% 실시하였다. 환수에는 과산화수소 100 ppm으로 소독된 해수를 사용하였다. Taurine-FTM {(주)삼양애니팜, 한국}의 유효성분 및 함량은 본제 1 ml 중 taurine 25 mg, vitamin B1 5 mg, vitamin B2 1.333 mg, vitamin B6 0.5 mg, vitamin C 10 mg, nicotinamide 10 mg, DL-methionine 15 mg, 및 dextrose 50 mg으로 구성되어 있으며 본제 원액을 5배

희석한 농도를 본 연구에서는 원액으로 사용하였다.

우선 넙치에 간 독성을 인위적으로 유발 시키고 자 설치류에 급성 간 독성 유발 물질로 알려진 thioacetamide (TAA, Wako, Japan)를 순치된 넙치를 대상으로 기본실험에서 간 독성을 유발시킬 수 있는 어체 100 g 당 적정 농도인 30 ppm을 각 어체에 복강으로 주사하였다. TAA는 Taurine-FTM주사 전과 후 그리고 동시에 주사하는 방법으로 각 실험 군당 6미씩을 대상으로 3회 반복하였다. 넙치의 혈액을 분리하여 간 독성 지표를 분석하기 위해 glutamic oxaloacetic transaminase (GOT)와 glutamic pyruvic transaminase (GPT) 분석 키트{(주)아산, 한국})를 사용하였다. 넙치의 간 독성 완화에 Taurine-FTM가 어느 정도의 효과가 있는지 알아보려고 자 첫째 Taurine-FTM 주사 후 TAA를 투여(이하 Taurine/TAA) 했을 시 간 독성의 변화를 알아보려고 자 Taurine-FTM를 상기와 같이 근육주사 한 후 12시간 지난 다음 TAA를 복강으로 투여 하였으며 24시간 후 미부에서 혈액을 채취하여 간 독성 수치를 측정하였다. 둘째 TAA 투여 후 Taurine-FTM를 주사(이하 TAA/TAA)했을 시 간 독성의 변화를 측정하기 위해 Taurine-FTM를 넙치에 주사하기 전에 TAA를 넙치의 복강으로 투여하여 먼저 간 독성을 유발시켰다. TAA 투여 후 24시간이 지난 다음 Taurine-FTM를 어체 kg 당 0.2 ml씩 근육 주사하였으며 24시간 후에 혈액을 채취하여 간 독성 수치를 측정하였다. 마지막으로 TAA와 Taurine-FTM를 동시에 투여(이하 TAA+타우린) 했을 시 간 독성의 변화를 알아보려고 자 양식 어류는 항생제 또는 다른 약물 등의 투여로 인해 간 독성이 유발될 수 있기 때문에 TAA를 Taurine-FTM와 동시에 투여했을 시 Taurine-FTM에 의해 간 독성이 어느 정도 완화될 수 있는지 측정하였다. TAA는 복강으로 Taurine-FTM는 근육 주사로 동시에 투여하였으며 24시간 후 혈액을 채취하여 간 독성 수치를 측정하였다.

Taurine-FTM의 자체가 넙치의 행동학적 및 생체적 안전성에 미치는 영향을 알아보기 위해 전체 실험에 적용되었던 어체 중 kg 당 0.2 ml의 농도와 그 기준으로 5배 농축된 용량의 타우린을 4미씩 근육으로 각각 주사하였다. 주사 후 1, 2 및 3일째 신장, 비장 및 주사 부위의 근육조직을 채취하

여 Bouin액에 24시간 동안 고정한 후 알코올 탈수 계열을 거쳐 파라핀으로 포매 한 다음 5 μ m의 절편 조직을 만들어 Mayer haematoxylin-eosin (H-E) 염색을 실시하여 광학현미경으로 관찰하였다. 또한 동일한 조건으로 처리한 남은 넙치를 대상으로 약 7일 간 행동학적 이상 유영을 관찰하였다.

Taurine-FTM가 체내에 흡수되었을 시 넙치의 선천성 면역체계에 미치는 효과를 분석하기 위해 혈청 내 가장 대표적인 면역 지표로 알려진 라이소자임과 보체(ACH₅₀)의 활성을 측정하였다. 대조군 및 실험군 당 각 10 미씩 시간적으로 서로 다른 3 반복 실험을 수행하였다. *Micrococcus lysodeikticus* (Sigma)를 0.2 M citrate phosphate buffer (pH 5.8)에 2 mg/ml 농도로 부유 시킨 용액을 96 well plate 각 well 당 70 μ l을 넣고 채취한 혈청을 30 μ l씩 분주한 후 30초부터 4분 30초까지 반응시켜 감소하는 흡광도의 양을 Sunrise micro plate reader (TECAN)로 405 nm에서 흡광도를 측정하였다. 분당 0.001의 흡광도가 감소하는 양을 1 unit로 표현하였다.

Alternative pathway complement hemolysis 50 (ACH₅₀) 측정은 Yano (1992)의 방법을 이용하여 분석하였다. 토끼의 혈액을 채취하기 위해 23G needle을 부착한 5 ml 주사기에 500 IU의 헤파린을 처리하고 이개정맥에서 혈액을 채취하여 Histopaque-1077 (Sigma)을 이용하여 적혈구를 분리하였다. 분리된 적혈구 (rabbit red blood cell, RaRBC)를 0.01 M ethylene glycol tetra acetic acid-Mg-gelatin veronal buffer (EGTA-Mg-GVB)로 2회 washing한 후 1×10^8 cells/ml의 농도로 희석하여 사용하였다. 넙치 혈청을 PBS로 12배 희석한 후 96 well plate에 well 당 200, 150, 100, 50 μ l씩 분주하고 EGTA-Mg-GVB를 각각의 well에 총량이 200 μ l가 되도록 분주하였다. RaRBC를 각각의 well에 100 μ l씩 분주하여 25°C에서 1시간 동안 반응시킨 후 220 $\times$ g, 4°C에서 5분간 원심 분리하였다. 형성된 상층액 100 μ l을 취하여 Sunrise micro plate reader (TECAN)를 이용하여 405 nm에서 측정하였으며 용혈된 적혈구 (Y)는 $Y/(1-Y)$ 공식을 이용하여 50%의 용혈을 계산한 뒤 unit/ml를 산출하였다. 본 연구에서 얻어진 결과는 PRIMER (Mc Graw-Hill, Inc., ver. 1.5)의

one way analysis of variance를 이용하여 평균과 표준편차(Mean $\pm$ S.D.)로 표현하였다. Student-Newman-Keuls test로 각 Group사이의 유의성을 검정하였으며 $p<0.05$ 일 경우 유의성이 있는 것으로 간주하였다.

본 연구에서 예비실험으로 다양한 농도의 TAA를 투여하여 간 독성을 유발시킨 후 GOT와 GPT를 분석한 결과 어체 100g 당 30 ppm 농도로 투여 시 GOT는 48시간 쯤 GPT는 72 시간 쯤 까지도 일정하게 높게 유지되는 것으로 나타났다 (Fig. 1). 그 이하의 농도에서는 TAA의 간독성 효과가 미약하게 나타나 Taurine-FTM 처리에 의한 효과를 확인할 수 없을 것으로 평가되었다 (결과 미제시). 측정된 이 두 효소는 모두 간세포 내에 존재하지만 GOT는 세포질과 미토콘드리아에 분포하고 있는 반면 GPT는 세포질에만 국한되어 있기 때문에 미토콘드리아가 파괴되는 심각한 간 독성이 유발되지 않는 한 GOT/GPT 비율은 1을 초과하지 않는 것 (GOT<GPT)으로 보고되고 있다(Takahashi, 2011).

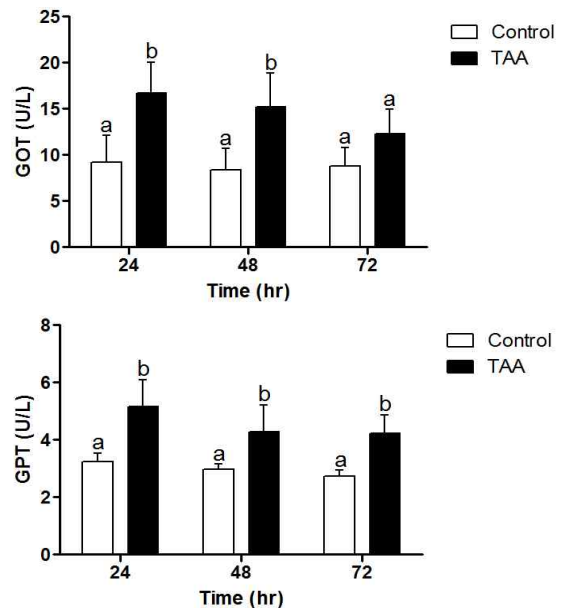


Fig. 1. Changes of GOT and GPT values over time for flounder after i.p. injection of TAA. TAA (30 ppm/100 g of fish) was i.p. injected followed by analysis of GOT and GPT values on different time zones. Control fish were i.p. injected with PBS. Different alphabet letters indicate significant statistical differences ($p<0.05$).

그러므로 본 연구에서 결정된 TAA농도(어체 100 g 당 30 ppm)는 GOT보다 GPT의 수치를 일정하게 높이는 것으로 보아 비록 간 독성을 유발시키지만 외부에서 주입되는 식품이나 약물에 의해서도 회복될 수 있는 적정 농도로 평가되었다.

복강으로 어체 100 g 당 30 ppm의 농도로 투여된 TAA가 일정기간 동안 간 독성을 유발시킨다는 사실을 확인한 후 근육 주사로 주입되는 Taurine-FTM의 간 독성 회복 효과 여부를 조사하기 전 Taurine-FTM 자체의 간 독성 유발 가능성에 대해서도 분석하였다. Fig. 2에 나타난 바와 같이 Taurine-FTM 투여하였을 시 비록 GOT 및 GPT의 수치는 모두 24시간 쯤 대조군에 비해 평균적으로 상승하였지만 그 이후 72시간 쯤까지는 대조군과 거의 차이가 없음을 알 수 있었다. Taurine-FTM를 단독으로 근육에 주사하였을 시 TAA만을 복강으로 투여하였을 때 보다 GOT 수치가 대조군에 비하여 평균적으로 높게 관찰이 되었다. 그 이유는 GOT가 심근세포, 근육세포, 적혈구는 물론 간세포에도 존재하며 GPT는 주로 간세포에만 존재하기 때문에 근육

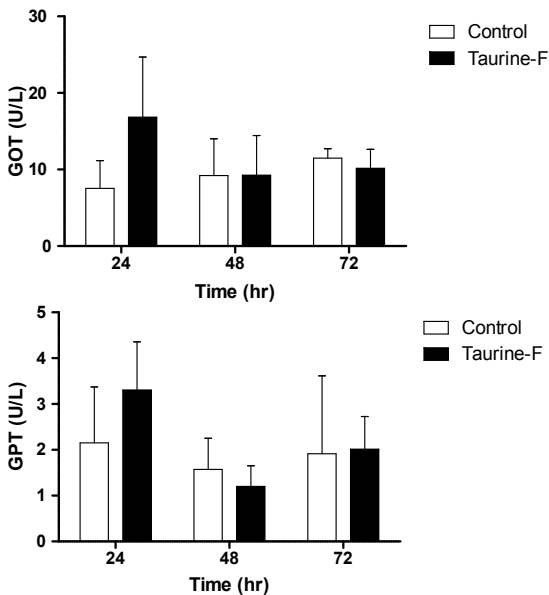


Fig. 2. Changes of GOT and GPT values over time for flounder after intramuscular injection of Taurine-FTM. Taurine-FTM (0.02 ml/100 g of fish) was i.m. injected followed by analysis of GOT and GPT values on different time zones. Control fish were i.m. injected with PBS.

주사로 투여된 Taurine-FTM가 간세포까지 도달하는 과정에서 다양한 조직세포들을 자극시켜 복강으로 투여한 TAA보다 GOT 수치가 단시간 내에 더 상승했을 것으로 추정된다.

Asaikkutti 등 (2016)은 민물 새우에 비타민 C 혼합 사료를 장기간 feeding 했을 시 대조군보다 GOT 및 GPT가 모두 증가하였다는 사실을 보고하였다. 이러한 결과는 장기간 사료를 통해 섭취된 vitamin C가 치명적인 간 독성을 유발시키지는 않지만 대조군에 비해 어느 정도 높다는 것은 지속적으로 간세포에 의해 vitamin C가 분해되기 때문일 것으로 해석된다. 본 연구에서는 비록 고농도의 비타민제가 투여되었지만 일회성이며 24시간의 짧은 시간 내에 간 수치가 일시적으로 증가할 수 있으며 시간이 경과 되면서 background의 수치로 낮아지는 것으로 추정된다.

Fig. 3는 TAA/타우린, 타우린/TAA 및 TAA+타

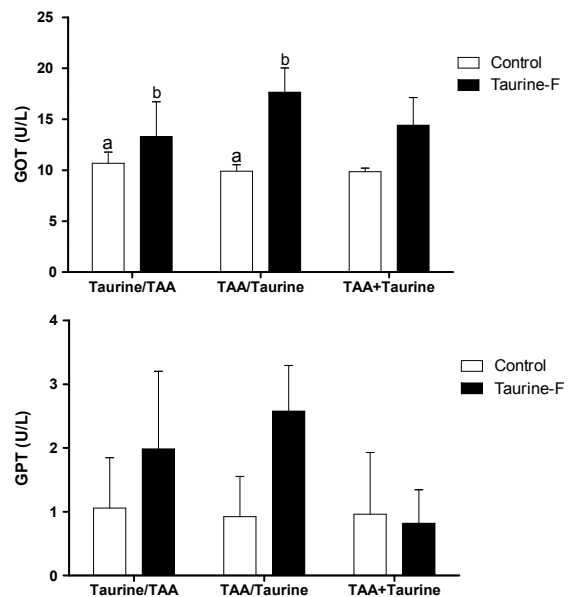


Fig. 3. Changes of GOT and GPT values on different time combination of Taurine-FTM and TAA injection for flounder. Taurine/TAA, TAA injection 12 hr after Taurine-FTM injection; TAA/Taurine, Taurine-FTM injection 24 hr after TAA injection; TAA+Taurine, simultaneous injection of both TAA and Taurine-FTM. Different alphabet letters indicate significant statistical differences ($p < 0.05$).

우린을 주사했을 시의 간독성의 변화에 대한 결과를 보여 주고 있다. GOT의 경우 TAA/타우린 에서는 평균적으로 약간 높았지만 타우린/TAA 및 TAA+타우린에서는 대조군에 비해 유의성($p<0.05$) 있게 높게 나왔다. 반면에 GPT의 경우 대조군과 유의적 차이는 없었지만 TAA/타우린, 타우린/TAA 그룹에서는 평균적으로 일정하게 높게 나왔으며 TAA+타우린의 경우 대조군과 차이가 없었다. 이러한 사실은 이전 실험의 결과 Fig. 1 및 2에서 알 수 있듯이 TAA와 Taurine-FTM의 투여경로가 달라 간독성을 나타내는 수치 중 GOT 보다는 GPT가 신빙성이 있는 것으로 판단된다. 이러한 관점에서 볼 때 TAA에 의해 유발된 간 독성 수치 중 GPT가 TAA+타우린 그룹에서 대조군과 같은 수준으로 낮아진 것은 TAA로 인한 활성산소들을 항산화제 역할을 하는 Taurine-FTM가 완전히 대사 시킴으로써 나타난 것으로 이해할 수 있다. 사실 Garvin 등 (2004)은 마우스를 모델로 타우린을 섭취 시켰을 시 산화스트레스를 감소시키는 것은 물론 심혈관계의 기능을 향상 시킨다는 사실을 보고하였다. 이러한 결과는 본 연구에서 관찰된 Taurine-FTM의 항산화 효과에 대한 가능성이 있음을 암시해 준다.

Taurine-FTM가 체내에 흡수되었을 시 넙치의 선천성 면역체계에 미치는 효과를 분석하기 위해 PBS를 근육 주사한 대조군과 Taurine-FTM를 근육 주사한 실험군에서 각각 1일과 2일 째에 혈액을 채취하여 혈청 내 가장 대표적인 면역 지표로 알려진 라이소자임과 보체의 활성(ACH₅₀)을 측정하였다. Fig. 4A는 라이소자임의 결과로서 PBS로 주사한 대조군에 비해 라이소자임의 수치가 1일 및 2일 차에서 모두 유의적으로 ($p<0.05$) 낮게 측정되었음을 알 수 있다. 비록 본 연구에서는 라이소자임의 활성을 선천성 면역지표로 선정하고 Taurine-FTM를 투여하였을 시 상승할 것으로 예상하였으나 일시적인 스트레스에 의해서 오히려 라이소자임의 활성이 높아질 수 있다는 사실을 알 수 있었다. Demers & Bayne (1997)는 무지개송어에 handling 스트레스와 같은 급성 스트레스를 가했을 시 라이소자임의 활성이 급격히 높아질 수 있다고 보고하였다. 이러한 결과는 대조군으로서 PBS를 주사할 때 보다 Taurine-FTM를 주사했을 때 급성으로 높아

진 라이소자임 활성이 Taurine-FTM에 의해 오히려 유의적으로($p<0.05$) 낮아질 수 있다는 사실을 암시해 준다.

Fig. 4B는 대표적인 혈청내 선천성 면역지표인 보체활성(ACH₅₀)의 결과로서 PBS로 주사한 대조군에 비해 Taurine-FTM를 주사한 실험군에서 ACH₅₀의 수치가 1일 차에서는 유의성($p<0.05$) 있게 증가하였으나 2일 차에서는 대조군에 비해 평균적으로는 높지만 상당히 낮게 감소 되었음을 알 수 있다. 이러한 결과는 주사 등과 같은 급성스트레스 발생 요인에 의해 야기될 수 있는 면역력의 약화를 주사와 동시에 투여된 Taurine-FTM가 짧은 시간 내 보체 활성을 높여줌으로써 면역력을 강화시켜 줄 수 있다는 사실을 암시해 주고 있다. 세포활성을 통한 비 특이적 면역기능을 측정한 결과 호흡폭발능과 대식세포능에 있어서 대조군에 비

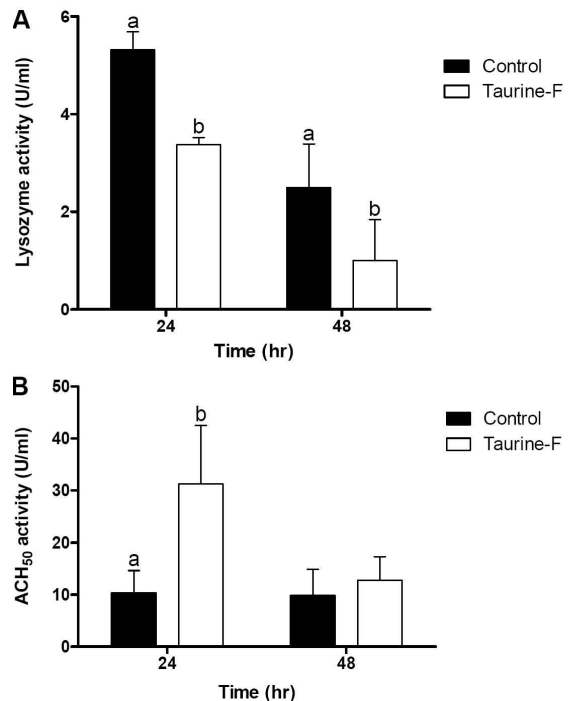


Fig. 4. Serum lysozyme activity and ACH₅₀ for flounder after Taurine-FTM injection. Serum lysozyme activity (A) and ACH₅₀ (B) were analyzed 24 hr and 48 hr, respectively after intramuscular injection of Taurine-FTM (0.02 ml/100 g of fish). Different alphabet letters indicate significant statistical differences ($p<0.05$).

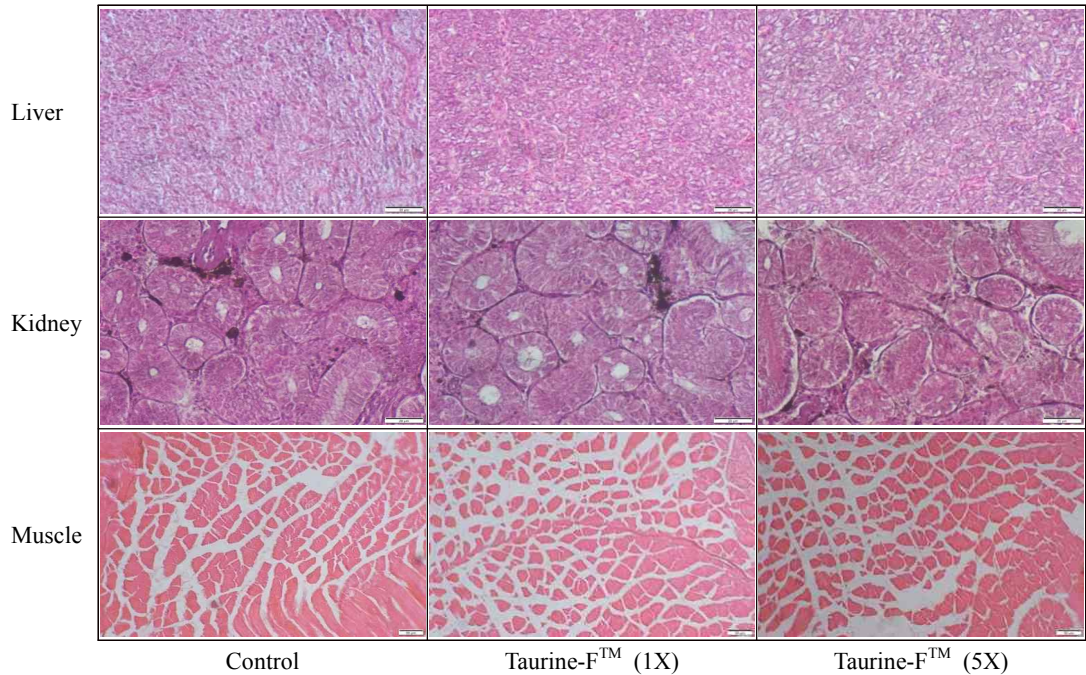


Fig. 5. Histological H-E staining of kidney, spleen and muscle tissues 3 days after Taurine-FTM injection. Taurine-FTM was intramuscularly injected at a concentration five times higher than the control. Kidney and liver (×400). Muscle (×100).

해 통계적 유의성이 관찰되지 않았다. 이러한 결과를 고려해 볼 때 넓치에 단 회 투여된 Taurine-FTM는 조직 내의 비 특이적 세포성 면역력을 순간적으로는 강화시킬 수는 있어도 시간이 지남에 따라 급격히 감소 될 수 있을 것으로 추정된다. 혈청 내의 선천성 면역 지표인 보체가 백혈구로부터 합성되어 나온 후 어느 정도 시간이 경과 함에도 유지되고 있다는 사실이 이러한 추정을 뒷 받침 해준다.

Fig. 5는 본 실험에 사용되었던 Taurine-FTM의 기본 농도와 5배 농축된 농도로 각각 근육주사 한 후 3일 쯤 각각 넓치를 해부하여 신장, 비장 및 주사 부위의 근육조직을 채취하여 병리조직학적 이상유무를 관찰한 결과이다. 주사 후 1일 및 2일 쯤의 조직학적 이상유무도 3일 쯤과 마찬가지로 대조군에 비해 특이적 이상 조직 조건이 관찰되지 않았다(1일 및 2일 쯤의 결과는 미제시). 또한 동일한 조건으로 Taurine-FTM 주사한 후 7일간 행동학적 이상 유무를 관찰하였으나 특이한 이상 행동 현상은 관찰되지 않았다.

결론적으로 Taurine-FTM를 넓치 kg당 0.2 ml의 5배를 투여하였을 시 독성에 의한 장기의 병변이나 조직학적 이상조건은 관찰되지 않았으며 간 독성 유발 물질과 동시에 투여되었을 시 급성 스트레스로 증가된 라이소자임 활성이 대조군에 비해 현저히 감소 되었다. 반면에 선천성 면역지표 중 대표적인 혈청내의 보체활성(ACH50)은 유의성 있게 증가 되는 것으로 관찰되었다. 따라서 본 연구에서 넓치를 대상으로 사용한 Taurine-FTM는 현장에서 백신을 접종하거나 병어에 항생제를 주사할 시 Taurine-FTM를 어 체중 kg 당 원액을 5배 희석한 농도를 기준 원액으로 0.2 ml의 용량으로 혼합하여 동시에 투여하게 되면 무독성의 안전성이 있는 제품으로 급성 스트레스를 효과적으로 완화 시켜 줄 수 있을 것으로 평가되었다.

사 사

본 논문은 2018년도 군산대학교 자체 국내 연구

교수 학술경비로 지원되었음

References

- Asaikkutti, A., Bhavan, P. S., Vimala, K., Karthik, M. and Cheruparambath, P.: Effect of different levels dietary vitamin C on growth performance, muscle composition, antioxidant and enzyme activity of freshwater prawn, *Macrobrachium malcolmsonii*. Aquaculture Reports, 3: 229-236, 2016.
- Demers, N. E. and Bayne, C. J.: The immediate effects of stress on hormones and plasma lysozyme in rainbow trout. Developmental & Comparative Immunol., 21: 363-373, 1997.
- Gavin, Y. O., Maria, G. T., Neelam, K., Taneya, H., Greg, J. W., Peter, L., Michael, J. S. and Peter, H. B.: Taurine supplementation reduces oxidative stress and improves cardiovascular function in an iron-overload murine model. Circulation, 109: 1877-1885, 2004.
- Kim, H. Y., Park, J. K. and Ahn, J. H.: Effects of Dietary Herbaceous Peat and Vitamin C and Immunity and Growth Performance in Holstein. Kor. J. Organic Agri., 20(4): 577-587, 2012.
- Seo J. S., Lee, J. H., Park, J. J., Choi, J. S., Bae, J. S. Lee, C. W. Yang, C. Y., Kang, Y. J., Choi, S. H. and Park, K. H.: Biochemical and stress-attenuating effects of butaphosphan-cyanocobalamin combination drug in olive flounder *Paralichthys olivaceus* Fisheries Science, 86: 375-384, 2020.
- Takahashi, S.: "Oxidative Stress" in mouse by environmental pollutants. In: T. Braunbeck, D. E. Hinton., (eds.), Gastroenterology, Tokyo, Japan, pp. 161-162, 2011.
- Yano, T.: Assay of hemolytic complement activity. In: Stolen, J. S., Fletcher, T. C., Anderson, D. P., Hattari, S. C., Rowley, A. F., editors. Tech. in fish Immunol. New Jersey: SOS Publications, pp, 131-141, 1992.

Manuscript Received : May 27, 2020

Revised : Jun 16, 2020

Accepted : Jun 17, 2020

